

UNTERSUCHUNG DER ANTIVIRALEN WIRKUNG DES
NATURSTOFFS SILVESTROL – ETABLIERUNG DER HELIKASE
EIF4A ALS NEUE ANTIVIRALE ZIELSTRUKTUR

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Apotheker Falk Wilhelm Schulte

aus Bramsche

Marburg (Lahn) 2019

Dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
(Hochschulkennziffer 1180)

vorgelegt am 13.03.2019.

Erstgutachter: Prof. Dr. Arnold Grünweller
Zweitgutachter: Prof. Dr. Roland K. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung am 30.04.2019

ZUSAMMENFASSUNG

Krebserkrankungen und virale Infektionen sind zwei der bedeutendsten Herausforderungen in der modernen Medizin. Jede für sich fordert täglich eine Vielzahl von Opfern und verlangt daher eine intensive Forschung nach neuen therapeutischen Ansätzen. Auf der Suche nach einer neuen Verwendung für ein bekanntes Arzneimittel, finden wir nicht nur einen neuen antiviralen Wirkstoff, sondern viel wichtiger: Eine neue Zielstruktur für eine neue Klasse zukünftiger Virusstatika.

Zu Beginn der Arbeit soll die Wirkung von Statinen, einer etablierten Wirkstoffgruppe zur Senkung des Plasmaspiegels von Cholesterin, auf das Proto-Onkogen Pim-1 untersucht werden. Die Behandlung der Krebszellen mit Simvastatin zeigt den erwarteten apoptotischen Effekt. Es wird ein Wirkmechanismus vorgestellt, der mit Hilfe von qRT-PCR Daten in der Zelllinie HepG2 bestätigt werden kann. Die beobachtete Wirksamkeit ist aber stark abhängig von der verwendeten Zelllinie. Im Laufe der Literaturrecherchen nach anderen Wirkstoffen, werden wir auf Silvestrol aufmerksam, einen Inhibitor von Pim-1.

Schnell wird klar, dass der Angriffspunkt, die humane Helikase eIF4A, nicht nur im onkogenen Kontext eine Rolle spielt, sondern auch bei der Infektion mit Viren von Bedeutung ist. eIF4A ist für die cap-abhängige Translation stark strukturierter 5'-UTRs wichtig. Diesem Ansatz folgend, werden in dieser Arbeit neben umfangreichen toxikologischen Untersuchungen, auch Ergebnisse vorgestellt, die eine Wirksamkeit gegen das HI-Virus und das Ebola Virus, sowie eine antivirale Breitbandwirkung unterstreichen. Die Untersuchungen der Zellviabilität, der Zytotoxizität und der Apoptoseinduktion, sowohl in Krebszelllinien wie auch in humanen Primärzellen, zeigen ein gutes toxikologisches Profil. Mit Hilfe eines speziell angepassten Dual-Luciferase-Assays (DLA) kann neben ersten Untersuchungen des Wirkmechanismus, auch eine antivirale Breitbandwirkung gezeigt werden. Im Rahmen zahlreicher Kooperationen wurden diese in Zellkulturexperimenten überprüft und die Übertragbarkeit auf tatsächlich infizierte Zellen belegt. Um den vollen Nutzen dieser Entdeckung ausschöpfen zu können wird ein „erweiterter DLA“ vorgestellt, der es ermöglicht, einfach und schnell neue Substanzen auf ihre spezifische inhibitorische Wirksamkeit gegen eIF4A zu untersuchen.

ABSTRACT

Cancer and viral infections are two of the most significant challenges in modern medicine. Each of them causes a vast amount of victims day by day and therefore needs intensive scientific efforts to find new strategies in their therapy. While searching for new approaches of already known drugs, we not only discovered a new antiviral substance, we more importantly found a new target for a new class of future antivirals.

At the beginning of our studies, we analyzed the effect of statins on the proto-oncogene Pim-1. Statins are a well known and widely used class of drugs, utilized to lower the concentration of cholesterol in the blood. The treatment of cancer cells with simvastatin ends in the expected apoptotic effect. We show a putative mechanism, proven by qRT-PCR data in the cancer cell line HepG2. But the effect is massively dependent on the used cell line. While searching for other compounds in the literature, we become aware of silvestrol, an inhibitor of Pim-1.

The target of silvestrol is the human helicase eIF4A, essential for the cap-dependent translation of highly structured 5'-UTRs. Soon it was obvious that this target is not only important in an oncogenic, but also in a viral context. Following this conclusion, this thesis will cover widely toxicological tests and studies of the antiviral effect of silvestrol against the HI-virus, the Ebola virus, and an overall broadspectrum antiviral activity. The tests of cell viability, cytotoxicity, and induction of apoptosis are performed in cancer cell lines as well as in primary human cells and show a tolerable toxicological profile. By using a customized dual-luciferase-assay (DLA), we can start investigating the mechanism of action and show a broad-spectrum activity. The DLA results and the transferability to truly infected cells are proven in multiple cell culture experiments, performed by cooperating labs. To make the benefit of this new target more accessible, we present an "advanced DLA". This assay offers the ability to test a huge amount of substances efficiently on their potency to selectively inhibit eIF4A.

DANKSAGUNG



„Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen.“

-Marcus Tullius Cicero-

Die Möglichkeit diese Arbeit zu schreiben, verdanke ich vielen Menschen in meinem Leben. Allen voran meinen Eltern, die mir nicht nur mein Studium der Pharmazie und damit die Grundlage für eine Promotion ermöglicht haben, sondern mir auch ein herrlich unwissenschaftlicher Gegenpol waren. Für die wissenschaftliche Seite fand ich in Prof. Dr. Grünweller nicht nur einen hervorragenden und sehr engagierten Betreuer sondern tatsächlich einen Doktorvater, der mir wissenschaftliches Denken und Arbeiten beigebracht hat und mich vom ersten Tag an mit seiner Begeisterung und Euphorie für das Thema angesteckt hat. Prof. Dr. Roland Hartmann stellte mir nicht nur sein Labor zur Verfügung, sondern half immer wieder mit einer neuen Perspektive auf die Arbeit zu schauen. Dr. Markus Gössringer war mir ein unschlagbarer Ratgeber bei den Widrigkeiten des Laboralltags und seine ruhige Art machte ihn zu einem wertvollen Freund. Dr. Kerstin Lange-Grünweller, die mich bereits in meinem ersten Praktikum im Arbeitskreis unter ihre Fittiche nahm und mir die spannende Welt der Zellkultur zeigte. Aus meiner talentierten Masterstudentin, Wiebke Obermann, wurde eine ausgezeichnete Kollegin, die mich mit ihrer exakten und zuverlässigen Arbeit unterstütz hat. Ich weiß unser Projekt bei ihr in guten Händen. Außerdem meine lieben Kollegen, die mir durch die vielen Momente halfen, die eine Promotion zu einer Mischung von Marathon, Hürdenlauf und Schnitzeljagd machen. Meine geliebte Svenja, die mir zugehört hat, wenn ich jemanden brauchte der mir zuhört, und die mich zuhören ließ, wenn ich besser zuhören sollte. Euch allen muss und möchte ich hierfür von ganzem Herzen Danken.

VERZEICHNISSE

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
ABSTRACT.....	II
DANKSAGUNG	III
VERZEICHNISSE.....	IV
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>VIII</i>
<i>Tabellenverzeichnis.....</i>	<i>XIV</i>
<i>Formelverzeichnis.....</i>	<i>XIV</i>
EINLEITUNG	1
<i>Krebs.....</i>	<i>1</i>
ENTSTEHUNG UND EIGENSCHAFTEN.....	1
BEHANDLUNG.....	3
PIM-1.....	3
MICRORNAS UND miR-33A.....	4
STATINE	6
WIRKMECHANISMUS	7
<i>Virusinfektionen.....</i>	<i>8</i>
VIREN.....	8
EINTEILUNG VON VIREN	8
VERMEHRUNG VON VIREN	9
PROPHYLAXE UND THERAPIE VON VIRUSINFESTIONEN	10
PROPHYLAXE	10
ANTIVIRALE CHEMOTHERAPIE.....	10
RNAI UND GENOME EDITING ALS NEUE ANSÄTZE.....	12
EBOLAVIRUS.....	13
AUFBAU.....	14

<i>Translationsinitiation in Eukaryoten</i>	15
CAP-ABHÄNGIGE TRANSLATIONSINITIATION.....	16
REGULATION DER TRANSLATIONSINITIATION.....	17
EUKARYOTISCHER TRANSLATIONS INITIATIONFAKTOR 4 A (EIF4A).....	21
ISOFORMEN.....	21
MECHANISMUS.....	22
EIF4A ALS ZIEL IN DER ONKOLOGIE.....	23
<i>Cyclopenta[b]benzofurane</i>	23
BIOSYNTHESE.....	23
SYNTHETISCHE DARSTELLUNG.....	24
SILVESTROL.....	25
MECHANISMUS.....	25
PHARMAKOKINETIK.....	26
MATERIAL UND METHODEN	27
<i>Zellkultur</i>	27
ALLGEMEINES.....	27
BESTIMMUNG DER ZELLZAHL.....	27
TRANSFEKTION.....	27
KREBSZELLINIEN.....	29
SUBKULTIVIERUNG VON ZELLEN.....	29
HEPG2.....	29
LS174T.....	30
SKOV3.....	30
HUH7.....	30
A549.....	30
PRIMÄRE ZELLEN.....	31
ISOLATION VON PBMCs.....	31
MONOZYTEN AUFREINIGUNG.....	32
MONOZYTEN DIFFERENZIERUNG.....	32
<i>toxizitäts-Assays</i>	34
WST-ASSAY.....	34
APOPTOSE-ASSAY.....	34
KOMBINIERTER APOPTOSE- UND VIABILITÄTS- UND ZYTOTOXIZITÄTS-ASSAY.....	35
LANGZEIT ZELLVIABILITÄTS-MESSUNG.....	35
<i>Bestimmung der Translationseffizienz</i>	37

DUAL-LUCIFERASE-ASSAY.....	37
ERWEITERTER DUAL-LUCIFERASE-ASSAY	38
HELIKASE-ASSAY.....	38
<i>Nukleinsäure Methoden</i>	40
GELELEKTROPHORESE	40
AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	40
POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE.....	40
NUKLEINSÄUREAUFREINIGUNG	42
RNA-AUFREINIGUNG.....	42
DNA-AUFREINIGUNG.....	42
PLASMID-PRÄPARATION.....	43
KONZENTRATIONSBESTIMMUNG.....	43
RNA.....	44
DNA.....	44
RNA.....	45
RNA-QUANTIFIZIERUNG.....	45
RADIOAKTIVE 5'-ENDMARKIERUNG.....	47
PROBING	48
DNA.....	51
KLONIERUNG	51
<i>Protein-Methoden</i>	56
ZELLYSE.....	56
SDS-PAGE.....	56
WESTERN-BLOT	57
DETEKTION	58
STRIPPEN UND ERNEUTE ANTIKÖRPER MARKIERUNG.....	58
ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	59
<i>Simvastatin als Inhibitor von Pim-1</i>	59
STATIN-EFFEKT AUF RNA-KONZENTRATIONEN	59
WIRKUNG AUF HEPG2 ZELLEN.....	60
WIRKUNG AUF LS174T	60
WIRKUNG AUF SKOV3 ZELLEN.....	61
SIMVASTATIN INDUZIERT APOPTOSE	62
<i>Silvestrol im onkogenen Kontext</i>	65
SILVESTROL SENKT PIM-1 TRANSLATION	66

MÖGLICHER G-QUADRUPLIX IN PIM-1 5'-UTR.....	67
STRESS INDUZIERT RESISTENZ VON PIM-1 GEGEN SILVESTROL.....	69
<i>Silvestrol im viralen Kontext.....</i>	<i>71</i>
SILVESTROL HEMMT HIV	71
SILVESTROL: WIRKUNG AUF DIE EBOLA VIRUS 5'-UTR	73
SILVESTROL HEMMT EBOV 5'-UTR TRANSLATION	73
EIGENSCHAFTEN DER 5'-UTR UND IHR EINFLUSS AUF IHRE EIF4A ABHÄNGIGKEIT	74
EIF4A: EIN TARGET FÜR EINE ANTIVIRALE BREITBANDWIRKUNG?	81
<i>Zytotoxische Eigenschaften von Silvestrol.....</i>	<i>85</i>
TOXIZITÄT IN KREBSZELLINIEN	85
AUSWIRKUNG AUF DIE PROLIFERATION	85
CHARAKTERISIERUNG DER TOXISCHEN EFFEKTE.....	85
TOXIZITÄT IN PRIMÄREN ZELLEN	88
PBMCS	89
MAKROPHAGEN	90
<i>Silvestrol-Analoga.....</i>	<i>91</i>
SULFONAMID-DERIVATE.....	92
ERSTE TESTREIHE.....	92
ZWEITE TESTREIHE.....	94
DRITTE TESTREIHE	96
WEITERE ANSÄTZE FÜR ANALOGA ZU SILVESTROL.....	98
ERSTE TESTREIHE	98
ZWEITE TESTREIHE.....	100
DRITTE TESTREIHE	103
<i>erweiterter Dual-Luciferase-Assay.....</i>	<i>105</i>
METHODISCHER ANSATZ	105
DER NEUE ANSATZ FUNKTIONIERT	106
SUBSTANZEN ZEIGEN KEINE EIF4A-ABHÄNGIGKEIT.....	107
<i>Helikase-Assay.....</i>	<i>109</i>
HELIKASE-ASSAY.....	109
PRINZIP	109
ETABLIERUNG DES HELIKASE-ASSAYS.....	110
ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK.....	117
<i>Zusammenfassung</i>	<i>117</i>

STATINE IM ONKOGENEN KONTEXT	117
WIRKUNG VON SIMVASTATIN AUF PIM-1 SPIEGEL.....	117
INDUKTION DER APOPTOSE DURCH SIMVASTATIN.....	117
SILVESTROL IM ONKOGENEN KONTEXT	117
SILVESTROL HEMMT DIE TRANSLATION VON PIM-1	117
SILVESTROL ZEIGT KEINEN EINFLUSS AUF G-QUADRUPLExE	118
STRESSINDUZIERTe RESISTENZ VON PIM-1 GEGEN SILVESTROL.....	118
SILVESTROL IM VIRALEN KONTEXT	118
ANTIVIRALE WIRKUNG VON SILVESTROL GEGEN HIV	118
ANTIVIRALE WIRKUNG AUF EBOV	118
ROLLE DER SEKUNDÄRSTRUKTUR EINER 5'-UTR.....	118
SILVESTROL ZEIGT VIRALE BREITBAND-WIRKUNG	119
ZYTOTOXISCHE EIGENSCHAFTEN VON SILVESTROL	119
TOXIZITÄTSTESTS IN KREBSZELLINIEN.....	119
TOXIZITÄTSTESTS IN PRIMÄREN ZELLEN.....	119
SILVESTROL-ANALOGA	119
ERWEITERTER DLA.....	120
HELIKASE-ASSAY.....	120
<i>Ausblick</i>	121
FAKTOREN FÜR EINE EIF4A-ABHÄNGIGKEIT	121
HIGH-THROUGHPUT SCREENING FÜR ANALOGA	121
VEREINFACHTE TESTS AUF EIF4A-EFFEKTE	121
KRISTALLSTRUKTUR VON SILVESTROL UND EIF4A.....	121
EIF4A ALS ANTIVIRALE ZIELSTRUKTUR.....	121
LITERATURVERZICHNIS	123
ANHANG.....	133

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: TODESURSACHEN NACH KRANKHEITEN	1
ABBILDUNG 2: HIPPOKRATES VON KOS	1
ABBILDUNG 3: DIE KENNZEICHEN FÜR KREBS	2
ABBILDUNG 4: EINFLUSS VON PIM-1 AUF ZELLZYKLUS UND APOPTOSE	4
ABBILDUNG 5: GENREGULATION DURCH MIRNAS.....	5

ABBILDUNG 6: STRUKTURFORMELN VON STATINEN.....	6
ABBILDUNG 7: WIRKMECHANISMUS STATINE	7
ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHER AUFBAU EINES VIRUS	8
ABBILDUNG 9: KLASSIFIKATION DER VIREN NACH GENOM.....	8
ABBILDUNG 10: ÜBERSICHT VIRALER VERMEHRUNGSZYKLUS.....	9
ABBILDUNG 11: ALI MAOW MAALIN.....	10
ABBILDUNG 12: EBOLAVIRUS. COLORIERTE ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME.....	13
ABBILDUNG 13: VERLAUF EBOLAVIRUS-AUSBRUCH 2014-16	13
ABBILDUNG 14: SCHEMA AUFBAU EBOLAVIRUS	14
ABBILDUNG 15: SCHEMA DES EBOLAVIRUS GENOMS.....	14
ABBILDUNG 16: ÜBERBLICK mRNA SYNTHESE UND PROZESSIERUNG IN EUKARYOTEN.....	15
ABBILDUNG 17: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER CAP-ABHÄNGIGEN TRANSLATIONSINITIATION	16
ABBILDUNG 18: CIS-WIRKENDE REGULATORISCHE RNA-STRUKTUREN IN EUKARYOTISCHEN 5'-UTRS.....	18
ABBILDUNG 19: RNA G-QUADRUPEX IN EUKARYOTISCHEN ZELLEN.....	19
ABBILDUNG 20: ÜBERSICHT VIRALER IRES-TYPEN	20
ABBILDUNG 21: EIF4A OHNE LIGAND IN DER OFFEN-KONFORMATION.....	21
ABBILDUNG 22: KONFORMATIONSÄNDERUNGEN VON DEAD-BOX HELIKASEN.....	22
ABBILDUNG 23: KONFORMATIONSÄNDERUNG VON EIF4A.....	22
ABBILDUNG 24: BIOSYNTHESE DER ROCAGLAMIDE	24
ABBILDUNG 25: STRUKTURFORMELN ROCAGLAMIDE	25
ABBILDUNG 26: STRUKTURFORMELN SILVESTROL UND SILVESTROLSÄURE.....	26
ABBILDUNG 27: ÜBERSICHT RNA-INTERFERENZ	28
ABBILDUNG 28: MIKROSKOPISCHE ANSICHT VON HEPG2 ZELLEN	29
ABBILDUNG 29: MIKROSKOPISCHE ANSICHT VON LS174T ZELLEN.....	30

ABBILDUNG 30: MIKROSKOPISCHE ANSICHT VON SKOV3 ZELLEN	30
ABBILDUNG 31: MIKROSKOPISCHE ANSICHT VON HUH7 ZELLEN.....	30
ABBILDUNG 32: MIKROSKOPISCHE ANSICHT VON A549 ZELLEN	30
ABBILDUNG 33: FICOLLGRADIENT, FRAKTIONEN NACH ZENTRIFUGATION	31
ABBILDUNG 34: REAKTIONSGLEICHUNG WST.....	34
ABBILDUNG 35: ABLAUF DES DUAL-LUCIFERASE-ASSAY.....	37
ABBILDUNG 36: SCHEMA EINER PLASMIDKARTE - pFR_HCV_XB MIT EINER 5'-UTR	51
ABBILDUNG 37: AUSSCHNITT DER PLASMIDSEQUENZ.....	51
ABBILDUNG 38: GIBSON ASSEMBLY. SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER METHODE.....	52
ABBILDUNG 39: SITE-DIRECTED MUTAGENESIS. SCHEMATISCHE DARSTELLUNG.....	52
ABBILDUNG 40: ARBEITSHYPOTHESE DER STATINWIRKUNG	59
ABBILDUNG 41: QRT-PCR DATEN VON HEPG2 ZELLEN NACH SIMVASTATIN-BEHANDLUNG	60
ABBILDUNG 42: QRT-PCR DATEN VON LS174T ZELLEN NACH SIMVASTATIN-BEHANDLUNG.....	61
ABBILDUNG 43: QRT-PCR DATEN VON SKOV3 ZELLEN NACH SIMVASTATIN-BEHANDLUNG	61
ABBILDUNG 44: CASPASE-ASSAY.....	63
ABBILDUNG 45: ZELLPROLIFERATION VON LS174T-ZELLEN	64
ABBILDUNG 46: WST-1 ASSAY – SIMVASTATIN-BEHANDLUNG IN LS174T-ZELLEN	64
ABBILDUNG 47: SILVESTROL-WIRKUNG AUF PIM-1 PIM-1 WIRD AUF PROTEINEBENE IN HEPG2 ZELLEN DURCH SILVESTROL DOSISABHÄNGIG IN SEINER EXPRESSION STARK GEHEMT.	65
ABBILDUNG 48: DUAL-LUCIFERASE-ASSAY – SCHEMATISCHER AUFBAU	65
ABBILDUNG 49: SILVESTROL WIRKUNG AUF PIM-1 UND HAUSHALTSGENE IM DLA	66
ABBILDUNG 50: VORHERSAGE DER SEKUNDÄRSTRUKTUR FÜR DIE PIM-1 5'-UTR.....	66
ABBILDUNG 51: ZIC-1 GQS IM DLA	67
ABBILDUNG 52: TRANSLATIONSEFFIZIENZ VON ZIC-1 UND ZIC-1 MUTIERT.....	67
ABBILDUNG 53: SILVESTROLWIRKUNG AUF GQS.....	68

ABBILDUNG 54: SILVESTROLWIRKUNG UNTER STRESSBEDINGUNGEN	69
ABBILDUNG 55: HI-VIRUS. COLORIERTE ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME	71
ABBILDUNG 56: SILVESTROLWIRKUNG AUF HIV 5'-UTR.....	71
ABBILDUNG 57: VORHERSAGE DER SEKUNDÄRSTRUKTUR FÜR DIE HIV 5'-UTR.....	71
ABBILDUNG 58: CA-P24 SPIEGEL BEI BEHANDLUNG MIT SILVESTROL.....	72
ABBILDUNG 59: CA-P24 SPIEGEL UNTER BEHANDLUNG MIT SILVESTROL.....	72
ABBILDUNG 60: EBOLAVIRUS. COLORIERTE ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME.....	73
ABBILDUNG 61: SILVESTROLWIRKUNG AUF EBOV 5'-UTRS.....	73
ABBILDUNG 62: VORHERSAGEN DER SEKUNDÄRSTRUKTUREN ALLER EBOV 5'-UTRS.....	74
ABBILDUNG 63: VORHERSAGEN DER SEKUNDÄRSTRUKTUREN DER 5' TERMINALEN HAIRPINS DER EBOV 5'-UTRS	75
ABBILDUNG 64: VORHERSAGEN DER SEKUNDÄRSTRUKTUREN DER GP, GP + VP24 HP, VP24 UND VP24 + GP HP 5'-UTRS.....	76
ABBILDUNG 65: SILVESTROLWIRKUNG AUF MUTIERTE 5'-UTRS VON GP UND VP24.....	76
ABBILDUNG 66: VORHERSAGEN DER SEKUNDÄRSTRUKTUREN DER VP35, VP35 Δ HP, NP UND NP Δ HP 5'-UTRS	77
ABBILDUNG 67: eIF4A ABHÄNGIGKEIT BEI DELETIERTER HAIRPIN-STRUKTUR	77
ABBILDUNG 68: VORHERSAGEN DER SEKUNDÄRSTRUKTUREN DER 5'-UTRS VON NP, NP MIT NHEI-SCHNITTSTELLE, VP35 UND VP35 MIT STABILISIERTEM HAIRPIN	78
ABBILDUNG 69: EINFLUSS VON MODIFIKATIONEN DER HAIRPIN-STRUKTUREN BEI NP UND VP35.....	78
ABBILDUNG 71: INDUZIERT EIF4A ABHÄNGIGKEIT BEI β -GLOBIN	79
ABBILDUNG 70: VORHERSAGEN DER SEKUNDÄRSTRUKTUREN DER 5'-UTRS VON β -GLOBIN UND MODIFIZIERTEN β -GLOBIN 5'-UTRS.....	79
ABBILDUNG 73: DELETION DER 5' - UND 3' -TERMINALEN HAIRPIN-STRUKTUREN DER NP 5'UTR.....	80
ABBILDUNG 72: VORHERSAGEN DER SEKUNDÄRSTRUKTUREN DER 5'-UTRS VON NP UND KONSTRUKTEN MIT DELETIERTEN HAIRPIN-STRUKTUREN.....	80

ABBILDUNG 75: HEMMUNG DER TRANSLATIONSEFFIZIENZ VERSCHIEDENER VIRALER 5'-UTRs UNTER SILVESTROL-GABE.....	81
ABBILDUNG 74: VORHERSAGEN DER SEKUNDÄRSTRUKTUREN VERSCHIEDENER VIRALER 5'-UTRs.....	81
ABBILDUNG 76: VORHERSAGEN DER SEKUNDÄRSTRUKTUREN VERSCHIEDENER VIRALER 5'-UTRs.....	82
ABBILDUNG 77: IC50 VON SILVESTROL IN HCoV-229E INFIZIERTEN MRC-5 ZELLEN.....	83
ABBILDUNG 78: EXPRESSION DER VIRALEN NSP8 mRNA-SPIEGEL UNTER BEHANDLUNG MIT VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN SILVESTROL	83
ABBILDUNG 79: ZELLVIABILITÄT VON KREBSZELLINIEN UNTER SILVESTROL BEHANDLUNG.....	85
ABBILDUNG 80: AUSWERTUNG DER TOXIKOLOGIE VON A549-ZELLEN	86
ABBILDUNG 81: TOXIKOLOGISCHES PROFIL DER ZELLINIE A549	86
ABBILDUNG 82: AUSWERTUNG DER TOXIKOLOGIE VON HEPG2-ZELLEN	87
ABBILDUNG 83: TOXIKOLOGISCHES PROFIL DER ZELLINIE HEPG2.....	87
ABBILDUNG 84: AUSWERTUNG DER TOXIKOLOGIE VON LS174T-ZELLEN	88
ABBILDUNG 85: TOXIKOLOGISCHES PROFIL DER ZELLINIE LS174T	88
ABBILDUNG 86: EINFLUSS VON SILVESTROL AUF PBMCs.....	89
ABBILDUNG 87: ZELLVIABILITÄT VON MAKROPHAGEN UNTER SILVESTROL-BEHANDLUNG.....	90
ABBILDUNG 88: SULFONAMID-LEITSTRUKTUR.	92
ABBILDUNG 89: ERGEBNISSE AUS DER ERSTEN TESTREIHE MIT ZUGEHÖRIGEN STRUKTURFORMELN DER SULFONAMID-DERIVATE	93
ABBILDUNG 90: STRUKTURFORMELN DER ZWEITEN TESTREIHE DER SULFONAMID-DERIVATE.....	94
ABBILDUNG 91: ERGEBNISSE AUS DER ZWEITEN TESTREIHE DER SULFONAMID-DERIVATE.....	95
ABBILDUNG 92: STRUKTURFORMELN DER DRITTEN TESTREIHE DER SULFONAMID-DERIVATE	96
ABBILDUNG 93: ERGEBNISSE AUS DER DRITTEN TESTREIHE DER SULFONAMID-DERIVATE	97
ABBILDUNG 94: STRUKTURFORMELN DER ERSTEN TESTREIHE WEITERER SILVESTROL-ANALOGA	98
ABBILDUNG 95: ERGEBNISSE AUS DER ERSTEN TESTREIHE WEITERER SILVESTROL-ANALOGA	99

ABBILDUNG 96: STRUKTURFORMELN DER ZWEITEN TESTREIHE WEITERER SILVESTROL-ANALOGA	100
ABBILDUNG 97: ERGEBNISSE AUS DER ZWEITEN TESTREIHE WEITERER SILVESTROL-ANALOGA	101
ABBILDUNG 98 ERGEBNISSE AUS DER DRITTEN TESTREIHE WEITERER SILVESTROL-ANALOGA UND DIE ZUGEHÖRIGEN STRUKTURFORMELN.....	102
ABBILDUNG 99: SCHEMA ZUM ERWEITERTEN DLA.	105
ABBILDUNG 100: SCHEMA ZUM DLA UNTER EIF4A-KNOCKDOWN.....	106
ABBILDUNG 101: ERWEITERTER DLA MIT SILVESTROL	106
ABBILDUNG 102: ERWEITERTER DLA DIVERSEER SILVESTROL-ANALOGA	108
ABBILDUNG 103: VORHERSAGEN DER SEKUNDÄRSTRUKTUR DER EBOV 5'-UTR VON VP35	109
ABBILDUNG 104: SCHEMA ZUM HELIKASE ASSAY.....	110
ABBILDUNG 105: ERSTER VERSUCH HELIKASE-SHIFT-ASSAY.	111
ABBILDUNG 106: HELIKASE-SHIFT-ASSAY MIT LÄNGERER SONDE	111
ABBILDUNG 107: HELIKASE-SHIFT-ASSAY MIT HÖHERER TEMPLAT-KONZENTRATION	112
ABBILDUNG 108: AUSWERTUNG DES GELBILDES AUS ABBILDUNG 109	113
ABBILDUNG 109: HELIKASE-SHIFT-ASSAY MIT VARIIERENDER SONDEN-KONZENTRATION.....	113
ABBILDUNG 110: HELIKASE-SHIFT-ASSAY MIT VARIIERENDER INKUBATIONSZEIT	113
ABBILDUNG 111: PROBINGGEL DES RNA-TEMPLATS.....	114
ABBILDUNG 112: VORHERSAGEN DER SEKUNDÄRSTRUKTUR DER EBOV 5'-UTR VON VP35.	114

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: MASTERMIX FÜR HELIKASE-ASSAY	38
TABELLE 2: ENZYMIX FÜR HELIKASE-ASSAY	39
TABELLE 3: BEISPIELANSATZ EINES HELIKASE-ASSAYS	39
TABELLE 4: ZUSAMMENSETZUNG PROBENPUFFER.....	41
TABELLE 5: ZUSAMMENSETZUNG PAA-LÖSUNGEN.....	41
TABELLE 6: KOMIGRATIONVERHALTEN VON BPB UND XCB.....	41
TABELLE 7: qPCR-BEDINGUNGEN.....	46
TABELLE 8: VERWENDETE qPCR-PRIMER.....	46
TABELLE 9: RADIOAKTIVE 5'-ENDMARKIERUNG – REAKTIONSANSATZ UND INKUBATIONSBEDINGUNGEN.....	47
TABELLE 10. RNA RÜCKFALTUNG - REAKTIONSANSATZ UND INKUBATIONSBEDINGUNGEN.....	48
TABELLE 11. ALKALISCHE HYDROLYSE - REAKTIONSANSATZ UND INKUBATIONSBEDINGUNGEN.	49
TABELLE 12: BLEISPLATUNG- REAKTIONSANSATZ UND INKUBATIONSBEDINGUNGEN.....	49
TABELLE 13: T1-VERDAU - REAKTIONSANSATZ UND INKUBATIONSBEDINGUNGEN.	50
TABELLE 16: PHOSPHORYLIERUNGSANSATZ.....	53
TABELLE 17: LIGATIONSANSATZ	53
TABELLE 18: PCR-SCHEMA KOLONIE-PCR.....	54
TABELLE 19: ZUSAMMENSETZUNG 15 % SDS-PAA GELE.....	56
TABELLE 20; EBOV 5'-UTR EIGENSCHAFTEN.	74
TABELLE 21: EBOV HAIRPIN EIGENSCHAFTEN	75

FORMELVERZEICHNIS

FORMEL 1.BERECHNUNG DER ZELLZAHL	27
FORMEL 2. BERECHNUNG DER RNA-KONZENTRATION	44
FORMEL 3. BERECHNUNG DER DNA-KONZENTRATION	44

EINLEITUNG



*„Glück, das ist einfach eine gute Gesundheit
und ein schlechtes Gedächtnis.“*

-Ernest Hemingway-

KREBS

Krebserkrankungen sind laut dem Statistischen Bundesamt die zweit häufigsten Todesursachen nach den Herz-Kreislaufferkrankungen in Deutschland. (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2018)

Seit den 1970er Jahren hat sich die Anzahl der an Krebs Erkrankten in Deutschland fast verdoppelt, was auch auf den demografischen Wandel und damit ein durchschnittlich höheres Lebensalter der Bevölkerung zurückzuführen ist. So erkrankten laut einer Studie des Robert-Koch-Instituts im Jahr 2013 rund 230.000 Frauen und 253.000 Männer in der Bundesrepublik neu an Krebs. Im gleichen Jahr lag die Zahl der durch Krebs verursachten Todesfälle bei etwa 223.000. (Robert Koch-Institut, 2016)

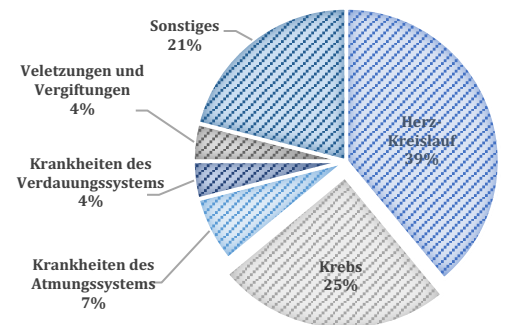


Abbildung 1: Todesursachen nach Krankheiten 2015 (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2018)

ENTSTEHUNG UND EIGENSCHAFTEN

Hippokrates von Kos soll dieser Krankheit ihren Namen gegeben haben. Er war sich noch sicher, dass Krebs durch ein Ungleichgewicht der Säfte entsteht. Fast zweieinhalb Jahrtausende später, können wir diese Krankheit zwar noch nicht heilen, sind ihrem Verständnis aber einen großen Schritt nähergekommen.

Es gibt neben einer genetischen Prädisposition auch extrinsische Risikofaktoren die als Auslöser angesehen werden. Hierzu zählen neben dem Konsum von Tabak und der Exposition gegenüber radioaktiver oder ultravioletter Strahlung, auch verschiedene

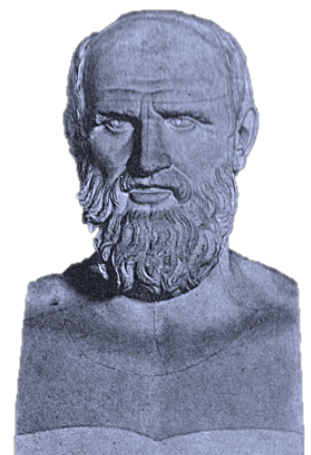


Abbildung 2: Hippokrates von Kos, Mediziner der griechischen Antike (verändert nach Baumeister, 1885)

Infektionskrankheiten, Hormontherapien und Übergewicht.
(Colditz, Sellers, & Trapido, 2006)

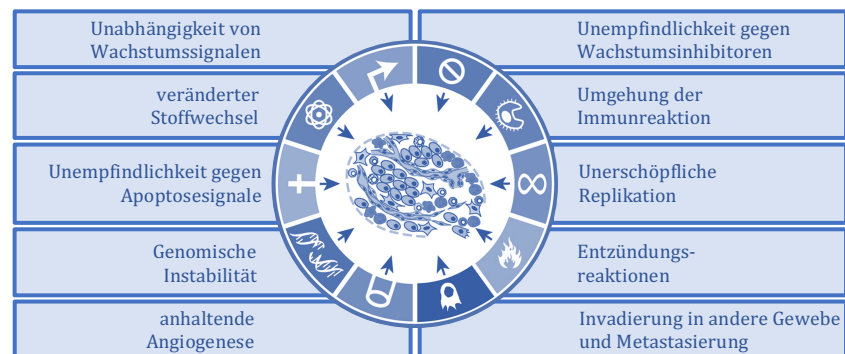


Abbildung 3: Die Kennzeichen für Krebs (verändert nach: Hanahan & Weinberg, 2011)

Man geht heute davon aus, dass Krebszellen bestimmte Kennzeichen aufweisen, die sie von einer gesunden Zelle unterscheiden. Neben einer Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, bei gleichzeitiger Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren und der Umgehung der Apoptose, kennzeichnen auch das Potential zur permanenten Replikation und die anhaltende Angiogenese Krebszellen aus. Das aber entscheidende Merkmal, das die Krebserkrankung von anderen gutartigen Raumforderungen unterscheidet, ist seine Fähigkeit in andere Gewebe einzuwandern und Metastasen zu bilden (Hanahan & Weinberg, 2000). Es konnten noch weitere Eigenschaften beschrieben werden, die für Krebszellen von essentieller Bedeutung zu sein scheinen. Hierzu gehören ein veränderter Stoffwechsel, der eine andauernde Proliferation der Tumorzellen unterstützen soll, sowie das Vermögen der Tumorzelle der körpereigenen Immunantwort auszuweichen. Begünstigt wird das Tumorwachstum zudem durch eine Entzündungsreaktion im betroffenen Gewebe sowie durch die genomische Instabilität, die sich durch zahlreiche Mutationen in den Krebszellen manifestiert. (Hanahan & Weinberg, 2011)

Ein einzelnes Krebs-induzierendes Ereignis reicht für eine solche Entwicklung einer gesunden Zelle hin zu einer Krebszelle vermutlich also nicht aus. Man geht hier von einem mehrstufigen Prozess aus und spricht auch von einer klonalen Evolution der Krebszelle. Daher können in einem Tumor auch unterschiedliche Subtypen von Krebszellen entstehen. (Visvader, 2011)

Bei diesen Krebs-induzierenden Ereignissen werden verschiedene Proto-Onkogene, Tumor-Suppressorgene oder miRNAs verändert. Onkogene sind Gene, welche Proteine codieren, die in die Kontrolle des Zellzyklus oder der Apoptose involviert sind. Bei den Produkten dieser Onkogene unterscheidet man sechs Gruppen: I) Transkriptionsfaktoren, II) Chromatin verändernde Proteine, III) Wachstumsfaktoren, IV) Wachstumsfaktor-Rezeptoren, V) Proteine von Signalkaskaden, VI) Apoptose-Regulatoren. (Croce, 2008)

BEHANDLUNG

Die Schwierigkeit bei der Behandlung von Krebs liegt in seiner Entstehung aus einer gesunden körpereigenen Zelle heraus. So ist es erst in der jüngeren Vergangenheit gelungen, die Unterschiede zwischen Krebszellen und gesunden Zellen herauszuarbeiten und für einen therapeutischen Ansatz zu nutzen.

Der Vielfältigkeit der verschiedenen Krebsarten wird daher heute mit einem immer weiterwachsenden Arsenal an therapeutischen Ansätzen begegnet. Neben der klassischen chirurgischen Resektion solider Tumore sind die Strahlentherapie und Chemotherapie wichtige Säulen in der onkologischen Medizin. Sie werden aber in zunehmendem Maße von neueren Methoden wie der Hormon- und Immuntherapie ergänzt. Selbst patientenindividuelle Therapien sind bereits im klinischen Alltag angekommen. (the National Cancer Institute, 2018)

Die bereits erwähnten Onkogene, wie zum Beispiel PIM-1, stellen ein mögliches Ziel für eine solche gezielte Therapie dar.

PIM-1

Die provirus integration site for Moloney murine leukemia virus 1 (Pim-1) ist ein Proto-Onkogen welches eine Serin/Threonin-Kinase codiert. Diese wird mit einer Vielzahl an Krebserkrankungen in Verbindung gebracht, wobei eine Hochregulation von PIM-1 häufig mit einer schlechten Prognose für den Patienten einhergeht. (Weirauch et al., 2013)

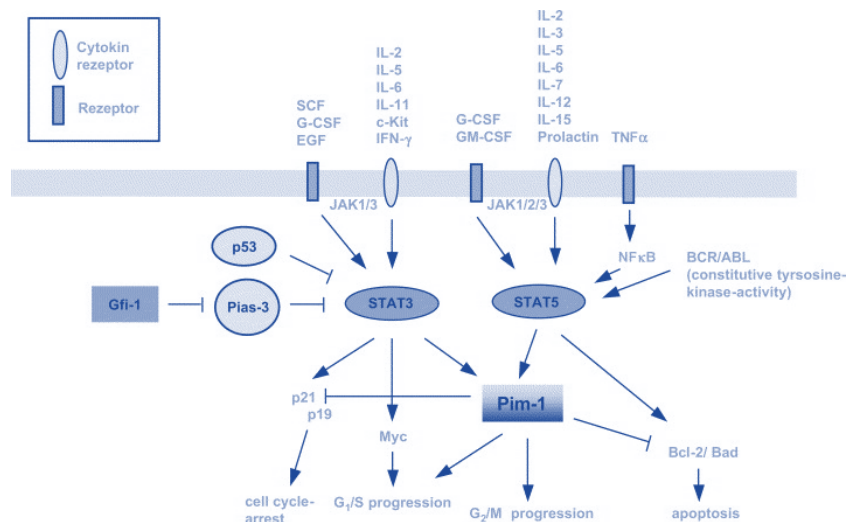


Abbildung 4: Einfluss von Pim-1 auf Zellzyklus und Apoptose. Schematische Abbildung der Vernetzung von Pim-1 innerhalb der Cytokine-Signalwege. Die Expression von Pim-1 steht unter direkter Kontrolle von STAT3 und STAT5, die bei Cytokin-Rezeptor-Stimulation der JAK-Kinasen durch Interleukine oder Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Durch Phosphorylierung unterschiedliche Proteine kann Pim-1 sowohl den Zellzyklus als auch die Apoptose aktivieren bzw. inaktivieren. (verändert nach: Bachmann & Möröy, 2005)

PIM-1 phosphoryliert verschiedene Proteine, die an der Steuerung des Zellzyklus sowie der Apoptose beteiligt sind (Abbildung 4). Da die Kinase konstitutiv aktiv ist und keiner posttranslationalen Modifikation bedarf, ist Ihre Aktivität direkt abhängig von ihrer Konzentration in der Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Pim-1 sowohl auf transkriptionaler, posttranskriptionaler, translationaler als auch posttranslationaler Ebene kontrolliert wird. (Bachmann & Möröy, 2005; Zhang, Wang, & Magnuson, 2007)

Ein Beispiel für eine posttranskriptionale Kontrolle der PIM-1 Expression ist die Regulation über die microRNA miR-33a. (Thomas et al., 2012)

MICRORNAS UND miR-33A

MicroRNAs (miRNAs) sind eine Familie von nicht codierenden kurzen RNAs, die sich häufig in den Introns verschiedener Gene finden und so cotranskribiert werden. Sie haben eine Länge von etwa 21-25 Nukleotiden und besitzen auf posttranskriptionaler Ebene eine negative Wirkung auf die Genexpression. MiRNAs

wurden zuerst im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt, kommen aber in nahezu allen Mehrzellern vor. (He & Hannon, 2004)

Die gereiften miRNAs entstehen aus langen, teils doppelsträngigen Primärtranskripten (pri-miRNA) über die Zwischenstufe einer precursor microRNA (pre-miRNA). Dabei werden die pri-miRNAs, die bei der Transkription von Genen cotranskribiert werden, von der RNase Drosha zunächst zu pri-miRNAs und anschließend von Dicer zu maturen miRNAs prozessiert; nachdem die pri-miRNAs aktiv mit Ran-GTP (Ras-related nuclear protein) über Exportin-5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert wurden. Hier wird die mature doppelsträngige miRNA von Helikasen aufgeschmolzen und einer der Beiden RNA-Stränge, die so genannte guide RNA, in den Ribonukleoproteinkomplex (miRNP) aufgenommen. Dieser ähnelt dem RNA-induced silencing complex (RISC) aus der RNA-Interferenz, ist aber nicht zwangsläufig identisch. (Bartel, 2004; Wienholds & Plasterk, 2005; Rossbach & Bindereif Albrecht, 2015)

Die miRNA kann nun an ihre Zielsequenzen binden (Abbildung 5). Dabei handelt es sich im Allgemeinen um kurze Sequenzen in der 3' untranslatierten Region (3'-UTR) von messenger RNAs (mRNAs). Da zwar die so genannte seed Region, also die Nukleotide 2 bis 8 vom 5' Ende aus, komplementär zur jeweiligen Zielsequenz sein müssen, ansonsten aber Fehlpaarungen möglich sind, kommen auf eine miRNA bis zu 200 Zielsequenzen, wobei es auf einer mRNA auch mehrere Zielsequenzen, der gleichen oder unterschiedlicher miRNAs, geben kann. Abhängig vom Ausmaß der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA wird entweder die Translation gehemmt oder die mRNA in sogenannten P-bodies abgebaut. (He & Hannon, 2004; Huntzinger & Izaurralde, 2011; Krek et al., 2005; Rossbach & Bindereif Albrecht, 2015)

Die miRNA miR-33a, die die Expression von Pim-1 reguliert, wird zusammen mit dem *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP) cotranskribiert, welches eine wichtige Funktion in der Regulation des Cholesterinstoffwechsels hat. (Thomas et al., 2012)

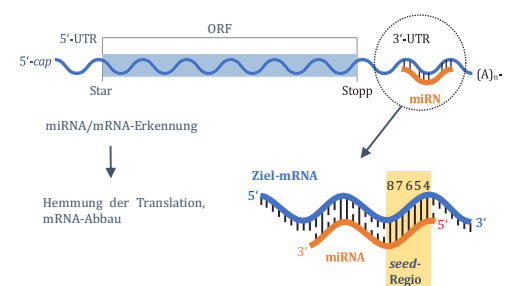


Abbildung 5: Genregulation durch miRNAs
(verändert nach: Rossbach & Bindereif Albrecht, 2015)

STATINE

The image displays the chemical structures of eight statins, categorized into two groups. The first group, on the left, includes Fluvastatin, Pravastatin, and Simvastatin. The second group, on the right, includes Rosuvastatin, Atorvastatin, and Pitavastatin. A central box highlights the structures of Compactin and Lovastatin, which are natural products. The structures are shown in a 2D representation, with stereochemistry indicated by wedges and dashes. The structures are labeled with their names: Fluvastatin, Pravastatin, Simvastatin, Compactin, Lovastatin, Rosuvastatin, Atorvastatin, and Pitavastatin.

Bereits im Jahr 1972 hat A. Endo mit ML-263B die Leitsubstanz dieser Gruppe entdeckt. Sie wurde interessanterweise aber bekannt unter dem Namen Compactin (Abbildung 6), da diese von Beecham Pharmaceutical Research Laboratory in England bereits zuvor isoliert wurde; doch Compactin zeigte keine Wirkung im Rattenmodell, und so hatte man Compactin als Fehlschlag betrachtet und die Forschung in England bald darauf eingestellt. (Endo, 2010; Fears, Richards, & Ferres, 1980; Sirtori, 2014) Endo konnte jedoch zeigen, dass Compactin in humanen Zellen durchaus wirksam ist. Im Jahr 1987 hat Lovastatin als erstes Statin von der

US-amerikanischen Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde (FDA) die Zulassung erhalten. Bald folgten weitere Vertreter dieser Gruppe, wie zum Beispiel Simvastatin. (Brown, Faust, Goldstein, Kaneko, & Endo, 1978)

WIRKMECHANISMUS

Statine inhibieren durch die Hemmung des Enzyms HMG-CoA-Reduktase im Mevalonat-Weg die Synthese von Mevalonat aus Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA), welches essentiell für die endogene Cholesterol-Produktion ist. (Davies et al., 2016; Sirtori, 2014)

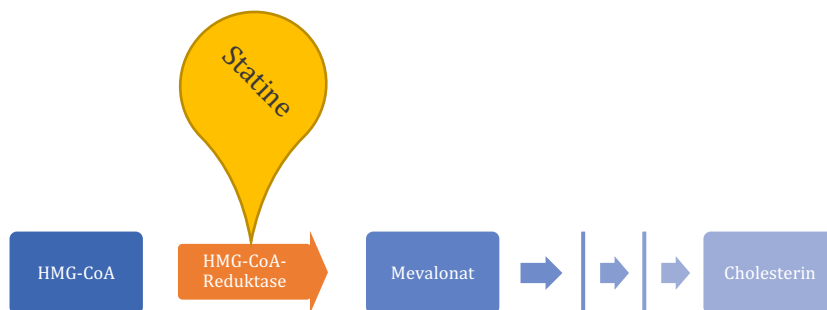


Abbildung 7: Wirkmechanismus Statine

Durch die Hemmung des Mevalonsäurestoffwechsels (Abbildung 7) kommt es auch zu Effekten auf Zwischenprodukte der Cholesterinbiosynthese. Hierzu zählen auch die Isoprenoide wie Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), welche in die posttranslationale Modifikation verschiedener Signalproteine involviert sind. Diese Effekte, die sich nicht auf die Senkung der LDL-C Konzentration im Blut direkt zurückführen lassen, also nicht dem primären Wirkmechanismus der Statine folgen, werden als pleiotrope Effekte bezeichnet. Hierzu zählen neben anderen auch eine antiinflammatorische und antioxidative Wirkung der Statine sowie eine Hemmung der Zellproliferation. (Bedi, Dhawan, Sharma, & Kumar, 2016; Thiery & Brügel, 2003)

Vergleicht man diese pleiotropen Effekte der Statine mit den Eigenschaften von Krebszellen wie sie Hanahan & Weinberg beschreiben, so fällt der mögliche Nutzen von Statinen in der Krebstherapie auf.

VIRUSINFEKTIONEN

VIREN

Unter Viren werden infektiöse Partikel verstanden, die sich nicht durch Teilung vermehren können, sondern sich in infizierten Wirtszellen replizieren. Man kann Viren daher als intrazelluläre Parasiten betrachten. Sie besitzen außerdem keinen eigenen Stoffwechsel.

Viren weisen ein Genom entweder aus RNA oder DNA auf, das von Proteinen umgeben, ein so genanntes Nucleokapsid bildet, welches wiederum von weiteren Proteinen umgeben sein kann und dann ein Kapsid darstellt. Einige Viren besitzen zudem eine Lipidmembran (vgl. Abbildung 8).

Es gibt bei Viren unterschiedliche Zustandsformen: i) Replikationsaktiver Zustand – repliziert sich aktiv in der Wirtszelle. ii) Latenzzustand – Integration der Erbinformation in das Wirtsgenom oder extrachromosomale Erhaltung in Form eines Episoms. Über exo- oder endogene Faktoren kann der latente in den aktiven Zustand überführt werden. (Modrow, Falke, Truyen, & Schätzl, 2010)

EINTEILUNG VON VIREN

Das *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) führt die taxonomische Einteilung der Viren durch (Abbildung 9). Hierzu bedient es sich verschiedener Kriterien: i) Art des Genoms – RNA oder DNA, einzel- oder doppelsträngig, Orientierung des Nukleotidstranges, usw. ii) Form der Kapside iii) Vorhandensein einer zusätzlichen Membranhülle zum Kapsid iv) Größe v) Replikationsort innerhalb der Wirtszelle. Für die weitere Unterteilung werden neben serologischen Eigenschaften auch Genomsequenzierungen hinzugezogen. (Modrow et al., 2010)

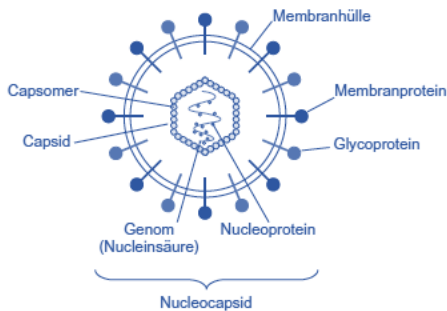


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Virus (nach: Modrow et al., 2010)

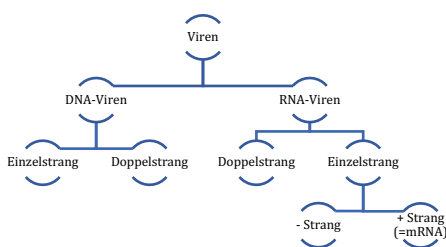


Abbildung 9: Klassifikation der Viren nach Genom

VERMEHRUNG VON VIREN

Die Vermehrung von Viren unterscheidet sich entsprechend der Art ihres viralen Genoms deutlich, doch lässt sich für alle Viren der Vermehrungszyklus in drei Abschnitte gliedern: i) **Replikation**, die Vervielfältigung des viralen Genoms, ii) **Genexpression**, die Transkription und Translation, iii) **Morphogenese**, den Zusammenbau und die Reifung zu neuen Viruspartikeln. (Hof, Dörries, Geginat, Schlüter, & Wendt, 2017; Kayser, Böttger, Deplazes, Haller, & Roers, 2014)

Genauer unterteilt man den Vermehrungszyklus in folgende Abschnitte (Abbildung 10):

1. **Adsorption** des Virus an die Wirtszelle mittels Wechselwirkung viraler Oberflächenproteine mit Rezeptoren auf der Wirtsmembran.
2. **Eindringen** des Virus in das Zellinnere nach Adsorption an der Zelloberfläche, abhängig von der viralen Morphologie, auf unterschiedlichen Wegen (z.B. über rezeptorvermittelte Endozytose bei Viren ohne Hülle).
3. **Freisetzung** des viralen Genoms aus dem Kapsid.
4. **Replikation** abhängig vom Virustyp im Zellkern oder im Zytoplasma und **Genexpression**.
5. **Zusammenbau** der neuen Virusbestandteile durch spontane Zusammenlagerung. Gewährleistung der korrekten Proteinfaltung unter Zuhilfenahme zellulärer oder viraler Chaperone.
6. **Freisetzung** der fertigen Viruspartikeln. Dies kann auf unterschiedlichen Wegen, abhängig vom Virustyp, erfolgen.

(Kayser et al., 2014)

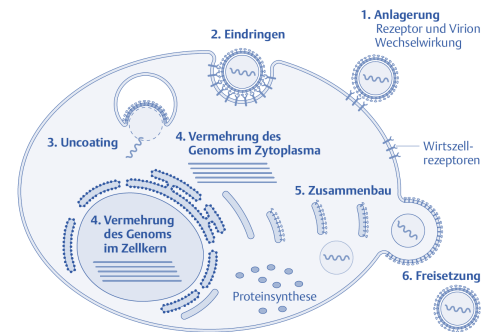


Abbildung 10: Übersicht viralen Vermehrungszyklus. (Kayser et al., 2014)

PROPHYLAXE UND THERAPIE VON VIRUSINFEKTIONEN

PROPHYLAXE



Abbildung 11: Ali Maow Maalin, ein somalischer Koch und Gesundheitsarbeiter aus Merca; er war der letzte bekannte Patient mit natürlich vorkommenden Pocken. (The Global Health Chronicles, 1977)

Neben der Impfung, also der aktiven oder passiven Immunisierung gegen bestimmte Viren, ist die Hygiene und damit auch die Desinfektion ein wichtiger Bestandteil der Prophylaxe gegen Virusinfektionen. Man unterscheidet die chemische und die physikalische Desinfektion. Wobei die chemische Desinfektion mit Hilfe von Tensiden oder Alkoholen besonders bei behüllten Viren eine gute Wirksamkeit aufweist, was auf die Empfindlichkeit der Lipidhülle gegenüber dieser Behandlung zurückzuführen ist. Unbehüllte Viren hingegen sind deutlich umweltresistenter. Zu den physikalischen Desinfektionsmethoden zählen neben Hitze und UV- auch Röntgenbestrahlung. Bereits das Autoklavieren kann Viren vollständig inaktivieren. (Hof et al., 2017; Kayser et al., 2014)

ANTIVIRALE CHEMOTHERAPIE

Die antivirale Chemotherapie zielt auf die bereits erwähnten gemeinsamen Abschnitte des viralen Vermehrungszyklus. Nachfolgend werden einige Beispiele antiviral wirkender Medikamente vorgestellt.

- **Adsorption:**

Pleconaril lagert sich in die Virusoberfläche ein und verdrängt dabei eine für die Adsorption wichtige Lipidstruktur.

- **Eindringen:**

- a. **Enfluvirtide** verhindert die Umlagerung des viralen Hüllproteins, so kann der Abstand von Virus zu Wirtszelle nicht überbrückt werden.
- b. **Maraviroc** bindet den viralen Entry-Rezeptor und verhindert so die Fusion von Virus und Wirtszelle.

- **Freisetzung:**

- a. **Amantadin** blockiert säureabhängige Kationenkanäle, die vom Virus zur Senkung des intraviralen

pH-Milieus benötigt werden, um eine Freisetzung des Viruskapsids zu ermöglichen.

- b. **Pleconaril** stört durch Umlagerung der Kapsidproteine ebenfalls die Freisetzung des viralen Genoms.

- **Replikation:**

- a. **Nukleosidische Inhibitoren der DNA-Synthese** führen zu einem Abbruch der DNA-Synthese durch modifizierte Nukleosidanaloga. Bekannte Beispiele sind hier: Azidothymidin und Aciclovir
- b. **Nicht-nukleosidische Inhibitoren der DNA-Synthese** besitzen keine Nukleosid-ähnliche Struktur. Zu dieser Gruppe zählen die „non nucleoside reverse transcriptase inhibitors“ (NNRTI), wie Delarvidin und Efavirenz, die nicht-kompetitiv an die "Reverse Transkriptase" bei Retroviren binden und so die Synthese sterisch behindern.

- **Integrationshemmer:**

Raltegravir blockiert die virale Integrase und verhindert so die Integration viralen Erbguts in das Wirtsgenom.

- **Genexpression:**

- a. **Fomivirsen** ist ein modifiziertes Oligonukleotid, komplementär zu einer mRNA des Zytomegalavirus und hemmt so die Translation des viralen Proteins. Es muss dem Patienten direkt in den Glaskörper des Auges injiziert werden. (vgl. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**)
- b. **Ribavirin** inhibiert als Nukleosidanalogon die Guanylyltransferase und dadurch die Ausbildung von 5'-cap-Strukturen. Dieser Mechanismus ist nicht virusspezifisch und schädigt somit auch massiv die Wirtszelle.

- **Zusammenbau:**

- a. **Proteaseinhibitoren**, wie Indinavir, Elfinavir und Ritonavir, hemmen gezielt virale Proteasen, die

essentiell für die posttranslationale Modifikation der Virusproteine sind.

- **Freisetzung:**

Neuraminidaseinhibitoren, zum Beispiel Zanamivir und Oseltamivir hemmen die virale Neuraminidase, die durch Spaltung von Glykoproteinen an der Zelloberfläche von Wirtszellen eine Bindung der freigesetzten Viren an diese verhindern soll.

Neben diesen antiviralen Chemotherapeutika wird noch das Zytokin Interferon- α (INF- α), häufig auch in pegylierter Form als sogenanntes PEG-Interferon, eingesetzt. Vornehmlich werden die Interferone zur Therapie der Hepatitis B und C eingesetzt. Sie binden an der Zelloberfläche an Interferonrezeptoren und führen so zu einer Aktivierung des JAK-STAT Signalwegs. Dies induziert die Transkription verschiedener antiviraler Gene und stimuliert somit die zelleigene Immunantwort. (Samuel, 2001; Hof et al., 2017)

CRISPR

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

Cas

CRISPR-associated

CRISPR/Cas9

Methode um gezielt dauerhafte Modifikationen auf genomischer Ebene durchzuführen.

Die Nuklease Cas9 kann über eine spezifische RNA zu der gewünschten Sequenz geführt werden und die DNA dort schneiden. Dies kann zu einer zufälligen Deletion bzw. Insertion und dadurch zu einer Zerstörung des Gens führen. Durch die Nutzung einer weiteren RNA als Vorlage mit der gewünschten Nukleotid-Sequenz, kann auch eine exakte Mutation durchgeführt werden.

RNAi UND GENOME EDITING ALS NEUE ANSÄTZE

RNA-Interferenz (RNAi) und die gezielte genomische Modifikation sind neue Ansätze in der Forschung nach antiviralen Therapieansätzen. In Anlehnung an den HIV infizierten „Berliner Patienten“, der nach einer Stammzelltransplantation eine funktionelle Heilung erfuhr, zielen gerade die genomischen Modifikationen dabei auf eine vollständige Eradikation des Virus, einschließlich des integrierten Virusgenoms. (Badia, Ballana, Esté, & Riveira-Muñoz, 2017; Hütter et al., 2009)

Schwachstellen bei der Therapie sowohl mit RNAi als auch mit genomischen Modifikation mittels CRISPR/Cas9 stellen zum einen die mögliche Resistenzbildung durch Mutationen der Zielsequenzen und die pharmakokinetische Problematik der Stabilität und gezielten Freisetzung im gewünschten Gewebe dar. (Badia et al., 2017)

Mit der siRNA Patisiran®, einem Arzneimittel gegen die Erbkrankheit hATTR- Amyloidose, hat 2018 das erste RNAi-Therapeutikum Einzug in den klinischen Alltag gefunden.

EBOLAVIRUS

Das Ebolavirus (EBOV) gehört neben dem Marburgvirus zur Familie der Filoviridae. Es zählt zu den Viren, die ein Hämorrhagisches Fieber verursachen können. Der Krankheitsverlauf, der als Ebola virus disease (EVD) bezeichneten Ebolavirus-Infektion, ist im Anfangsstadium einer Grippe sehr ähnlich, entwickelt sich aber im weiteren Verlauf schnell über Blutungen und Schock hin zum Multiorganversagen. In verschiedenen Ausbrüchen zeigte sich eine Letalität von über 90 %. Erstmals wurde ein Ebolavirus Ausbruch 1976 in Zaire beschrieben, der heutigen Demokratischen Republik Kongo. Bis heute sind neben dem *Zaire ebolavirus* (ZEBOV), vier weitere Stämme bekannt: *Sudan ebolavirus* (SUDV), *Bundibugyo ebolavirus* (BDBV), *Tai Forest ebolavirus* (TAFV) und *Reston ebolavirus* (RESTV). (Pacheco, Rodrigues, & Da Silva, 2016)



Abbildung 12: Ebolavirus. Colorierte elektronenmikroskopische Aufnahme. (Frederick A. Murphy (CDC), n.d.)

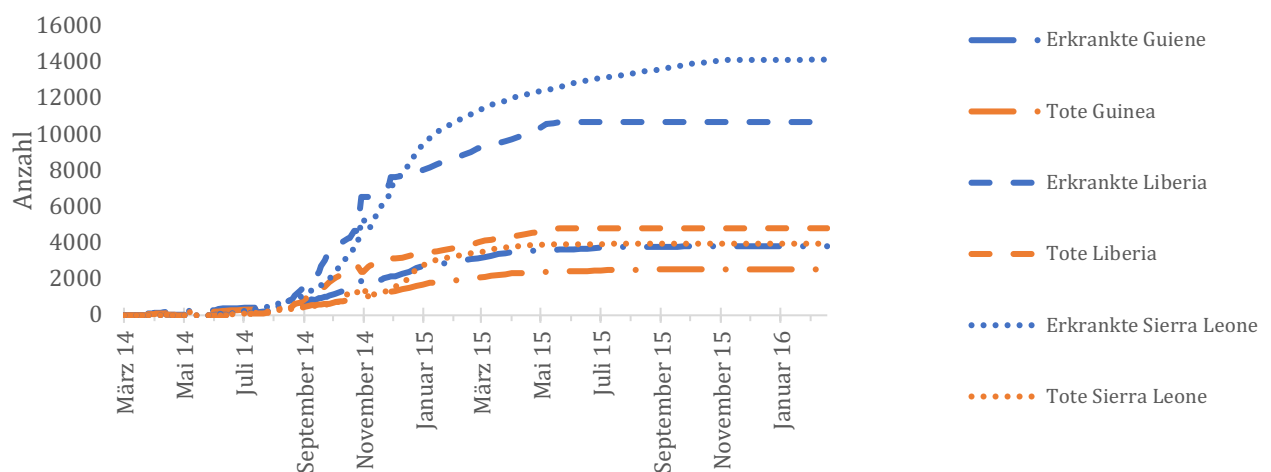


Abbildung 13: Verlauf Ebolavirus-Ausbruch 2014-16. (nach: Centers for Disease Control and Prevention, 2016)

Der bis heute größte Ausbruch fand in den Jahren 2014 bis 2016 in Westafrika statt und erstreckte sich hauptsächlich über die Länder Liberia, Guinea und Sierra Leone (Abbildung 13). Mit 28.652 dokumentierten Ebola-Erkrankten und 11.325 Todesfällen, war die Letalität bei diesem Ausbruch vergleichsweise gering. (Mérens, Bigaillon, & Delaune, 2018)

“There is no effective prophylactic protocol for Ebola. The available treatment can be summarized as palliative care, relief of symptoms and supportive measures.”

(Pacheco et al., 2016)

Nach dem Eindringen des Ebolavirus in den Körper, sind Dendritische Zellen und Makrophagen die ersten Zellen, die infiziert werden. Die Infektion breitet sich dann über sekundäre lymphatische Organe, wie der Leber, weiter aus. Durch den massiven Befall antigenpräsentierender Zellen kommt es zu einer veränderten Immunantwort, die mit einer unkontrollierten Freisetzung von Mediatoren einhergeht und unter anderem die hämorrhagischen Symptome am Höhepunkt der Infektion verursacht. (Rougeron, Feldmann, Grard, Becker, & Leroy, 2015)

AUFBAU

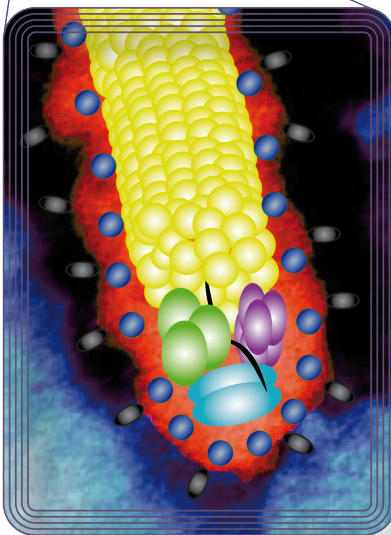
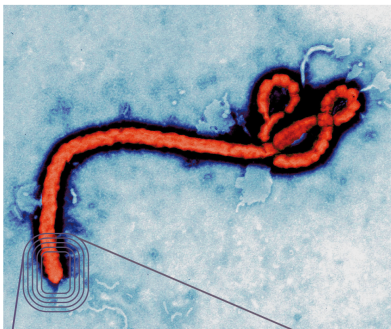


Abbildung 14: Schema Aufbau Ebolavirus
(verändert nach: Frederick A. Murphy (CDC), n.d.)

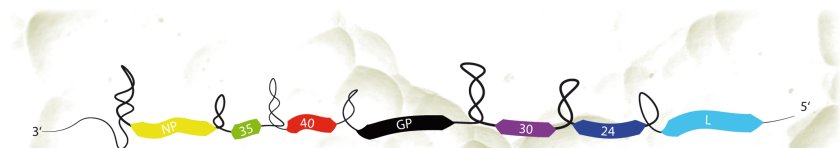


Abbildung 15: Schema des Ebolavirus Genoms (verändert nach: Messaoudi et al., 2015)

Das Ebolavirus besitzt ein negativ orientiertes, einzelsträngiges RNA-Genom mit einer Größe von etwa 19 kb. Es unterteilt sich in sieben Gene, die jeweils eine eigenständige transkriptionale Einheit bilden. Es werden *nucleoprotein* (NP), *viral protein 35* (VP35) und VP40, sowie *glycoprotein* (GP), VP30, VP24 und die virale Polymerase (L) kodiert (Abbildung 15 und Abbildung 14). Eine Besonderheit der Filoviridae sind ihre ungewöhnlich langen nicht-codierenden Bereiche am 5'- und 3'-Ende ihrer mRNAs. (Messaoudi, Amarasinghe, & Basler, 2015) In den Bereichen zwischen den Genen liegen Regulationsbereiche (*regulatory regions*), die die 3'-untranslatierte Region (UTR) des vorangehenden Gens, hochkonservierte Start- und Stoppsignale der Transkription und die 5'-UTR des nachfolgenden Gens enthalten. Diese Start- und Stoppsignale können entweder überlappen oder durch intergenische Regionen unterschiedlicher Länge voneinander getrennt vorliegen. (Neumann, Watanabe, & Kawaoka, 2009)

Die viralen mRNAs weisen 5'-terminal in ihren 5'-UTRs eine konservierte Nukleotidsequenz auf: 5' – GA $\frac{G}{U}$ GAAGAUUAA. Laut bioinformatischer Strukturvorhersagen sind diese Sequenzen Be-

standteil ausgeprägter Sekundärstrukturen, die vermutlich der Regulation der viralen Genexpression in der Virus-Familie Filoviridae dienen. (Mühlberger et al., 1996)

TRANSLATIONSINITIATION IN EUKARYOTEN

Die zuvor beschriebenen Themenbereiche, sowohl Krebs- als auch Virus-Erkrankungen, stellen für den Menschen bedeutende Gebiete der Medizin und Biologie dar. Bei beiden Erkrankungen ist die Proteinbiosynthese für das Verständnis ihrer Pathogenese wie ihrer möglichen Therapien besonders wichtig.

Die Proteinbiosynthese kann in drei Phasen unterteilt werden: Initiation, Elongation und Termination.

Die Translationsinitiation ist die Einleitung der Proteinbiosynthese durch Zuführung des Ribosom-Met-tRNA_i-Komplexes an das Startcodon einer mRNA. (Poulin & Sonenberg, 2013)

Im Gegensatz zu Prokaryoten, die über polycistronische mRNAs verfügen und bei denen die Translation parallel zur Transkription im gleichen Kompartiment abläuft, ist die Transkription und die Translation bei Eukaryoten durch die Kernmembran räumlich getrennt. Die Transkription im Nukleus liefert eine prä-mRNA, die erst weiter prozessiert werden muss. Dies umfasst im Wesentlichen die drei Schritte, capping, splicing und tailing (Abbildung 16).

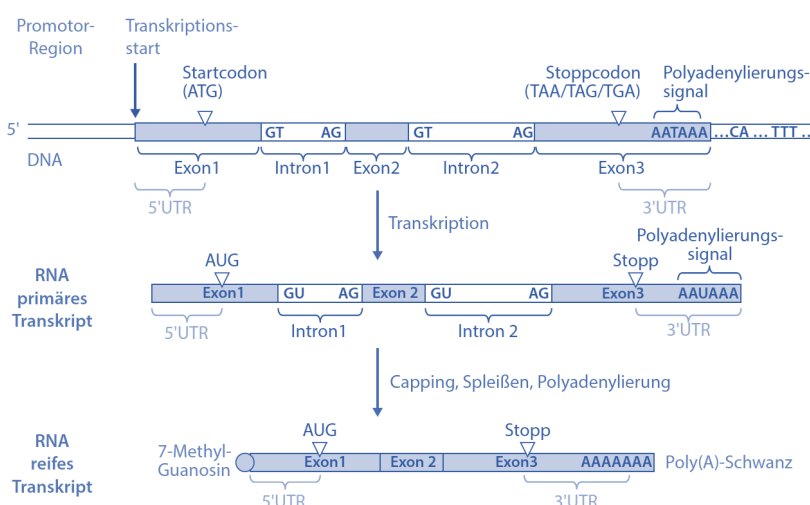


Abbildung 16: Überblick mRNA Synthese und Prozessierung in Eukaryoten (Schmidt, 2016)

Beim capping wird die mRNA mit einem 7-Methyl-Guanosin am 5' Ende versehen, was neben einem Schutz vor Abbau durch Exonukleasen, vor allem auch der Translationsinitiation und dem Transport aus dem Nukleus in das Cytoplasma dient.

Das Spleißen (splicing) kürzt die Prä-mRNA durch Deletion der Introns und Ligation der Exons in korrekter Reihenfolge.

Vom Tailing spricht man bei der Verlängerung der mRNA um einen Poly(A)-Schwanz durch die Polymerase II. Auch hier schützt die Modifikation der mRNA die selbige vor Abbau wie beim Capping und dient gleichzeitig der Translationsinitiation. Im Verlauf der Initiation wird der Poly(A)-Schwanz durch das Poly(A)-bindende Protein gebunden und zyklisiert im weiteren Verlauf mit der 5'-Cap-Struktur über den eukaryotischen Initiationsfaktor (eIF) 4E. (Schmidt, 2016)

CAP-ABHÄNGIGE TRANSLATIONSINITIATION

Die Translationsinitiation lässt sich in folgende Schritte unterteilen (Abbildung 17):

- **Bildung des 43S Präinitiationskomplexes (PIC).** Der ternäre Komplex aus eIF2, GTP und Met-tRNA_i bindet zusammen mit anderen Initiationsfaktoren (eIF1, eIF1A, eIF3 und eIF5) an die 40S ribosomale Untereinheit und bildet so den 43S PIC.
- **mRNA Aktivierung.** Durch den Initiationsfaktor eIF4F, bestehend aus dem Cap-bindenden Protein eIF4E, dem koordinierenden Protein eIF4G und der Helikase eIF4A, wird die zu translatierende mRNA aktiviert. Zunächst bindet eIF4E an die m⁷G Cap-Struktur der mRNA, dann entwindet eIF4A die 5' terminalen Sekundärstrukturen und eIF4G führt durch Bindung an das Poly(A) bindende Protein (PABP) zu einer Zyklisierung der mRNA. Außerdem verbindet eIF4G die aktivierte mRNA mit dem 43S PIC durch Interaktion mit eIF3 und eIF1.

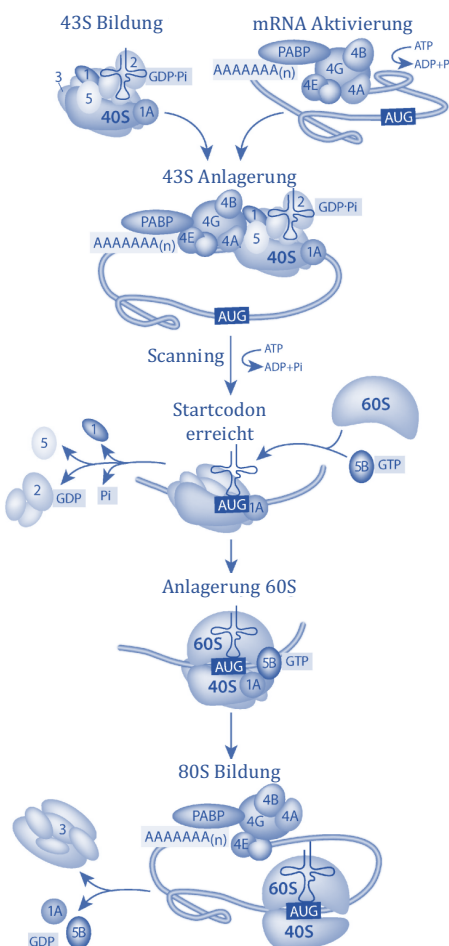


Abbildung 17: schematische Darstellung der cap-abhängigen Translationsinitiation (verändert nach: Haimov, Sinvani, & Dikstein, 2015)

- **Anlagerung des 43S PIC.** Durch die Initiationfaktoren eIF1 und eIF3 bindet der 43S PIC dann an die zuvor entwundene cap-Region der aktivierten mRNA.
- **Scanning.** Nun wandert unter ATP-Verbrauch der gebundene 43S PIC entlang der mRNA in 3'-Richtung, bis durch Basenpaarung mit der Met-tRNA_i das Startcodon (AUG) erreicht wird. Bei diesem Vorgang befindet sich der PIC in einer offenen Konformation und die Met-tRNA_i besetzt die ribosomale P-Stelle nicht vollständig. Parallel werden vorhandene Sekundärstrukturen von Helikasen wie eIF4A destabilisiert. eIF2 hydrolysiert, unter Beteiligung von eIF5, bereits teilweise sein gebundenes GTP und bildet so einen stabilen eIF2-GDP-P_i Zustand.
- **Erreichen des Startcodons.** Sobald der PIC das Startcodon erreicht, nimmt er unter Freisetzung von eIF1, eIF5 und eIF2, GDP und P_i die geschlossene Konformation ein, bei der der Komplex förmlich in die mRNA einrastet und die Met-tRNA_i die P-Stelle voll besetzt.
- **Anlagerung der 60S Untereinheit.** eIF5B und eIF1A vermitteln nun die Rekrutierung der großen Ribosomenuntereinheit an den PIC und es kommt zur...
- **Bildung des 80S Komplexes.** Er löst sich von eIF4F und auch eIF3 wird freigesetzt. Die Hydrolyse von GTP zu GDP durch eIF5B führt zur Dissoziation von eIF5B und eIF1A. Die Elongation beginnt.

(Haimov, Sinvani, & Dikstein, 2015)

REGULATION DER TRANSLATIONSINITIATION

Die geschätzte mittlere Halbwertszeit von mRNAs, muriner embryonaler Stammzellen, liegt bei 7,1 Stunden; und weniger als 100 mRNAs, von über 19.000 untersuchten Genen, zeigen eine Halbwertszeit von unter einer Stunde. (Haimov et al., 2015) Dies macht deutlich, dass in der Mehrheit der Fälle nur eine Regulation auf Translationsebene eine zeitnahe Steuerung der Proteinbiosynthese ermöglicht. (Hershey, Sonenberg, & Mathews, 2012; Sonenberg & Hinnebusch, 2009)

MODIFIKATION DER 5'-UTR

Im Zuge der Entwicklung der Säugetiere, bis hin zum Menschen, ist die Größe des Genoms stetig gewachsen. Gerade die untranslatierten Bereiche haben an Länge zugenommen, die 5'-UTRs jedoch weniger als die 3'-UTRs. Da die untranslatierten Bereiche der mRNAs weniger stark von Ribosomen frequentiert sind und damit zugänglicher für andere Moleküle und Komplexe, bieten sich diese für die Regulation der Translation an. Im Gegensatz zur DNA sind die regulativen Eigenschaften von RNA nicht hauptsächlich abhängig von der Primärstruktur, sondern ergeben sich vielmehr aus der Struktur, die sich aus der Kombination von Primär- und Sekundärstruktur ableitet und von RNA-bindenden Proteinen erkannt wird. (Leppek, Das, & Barna, 2017; Pesole et al., 2001) So finden wir in den 5'-UTRs eukaryotischer mRNAs eine Vielzahl von Regulationsmotiven (Abbildung 18).

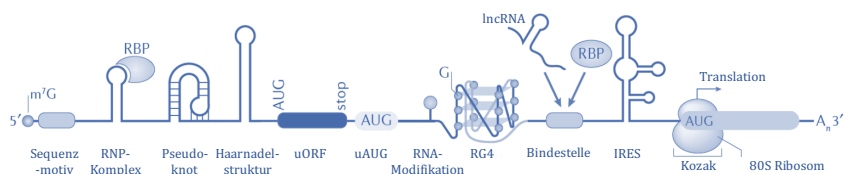


Abbildung 18: Cis-wirkende regulatorische RNA-Strukturen in eukaryotischen 5'-UTRs, die die mRNA-Translation beeinflussen. Die 7-Methylguanosin (m⁷G) 5' Cap-Struktur (Kreis) am 5'-Ende, sowie der Poly(A)-Schwanz (A_n) am 3'-Ende, fördern die Translation. Die 5' untranslatierte Region (UTR) enthält sekundäre und tertiäre Struktur- und Sequenzelemente. RNA-Strukturen wie *pseudoknots*, *hairpins*, RNA G-quadruplexe (RG4s), sowie *upstream open reading frames* (uORFs) und *upstream start-codons* (uAUGs) inhibieren hauptsächlich die Translation. Wohingegen *internal ribosomal entry sites* (IRESs) die Translation unabhängig von der 5' Cap-Struktur vermitteln. Andere RNA-Modifikationen, bzw. RNA-Bindeproteine (RNPs) und lange nicht codierende RNAs (lncRNAs), die mit RNA-Bindestellen (binding site) interagieren oder ribonucleoprotein (RNP) Komplexe bilden beeinflussen zusätzlich die Translation, genauso wie Kozak Sequenzen in der Nähe des Start-Codons. (verändert nach: Leppek et al., 2017)

RNA G-QUADRUPLIX (RG4)

Ein G-Quadruplex beschreibt eine extrem stabile Sekundärstruktur, die sowohl bei DNA als auch bei RNA vorkommt. Sie ist aus mehreren planaren, übereinander liegenden Ebenen von jeweils vier Guaninen aufgebaut. Jeweils ein Guanin ist über eine Hoogsteen-Basenpaarung mit zwei weiteren Guaninen gebunden.

Koordiniert über ein monovalentes Kation, hauptsächlich Kalium, bilden drei oder mehr solcher Ebenen einen G-Quadruplex aus. (Fay, Lyons, & Ivanov, 2017)

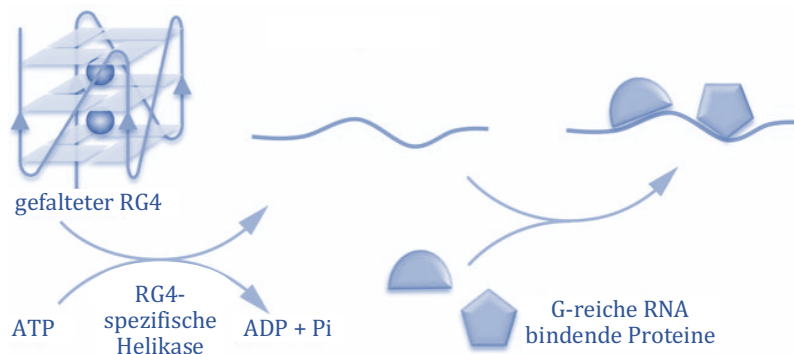


Abbildung 19: RNA G-Quadruplex in eukaryotischen Zellen (verändert nach: Guo & Bartel, 2016)

Untersuchungen der RNA Sekundärstrukturen zeigten, dass es zwar über 10.000 potentielle RG4-Motive in eukaryotischen Zellen gibt, diese aber überwiegend *in vivo* nicht gefaltet in der Zelle vorliegen. Es wird vermutet, dass in Eukaryoten bestimmte Helikasen die RNA G-Quadruplex Strukturen aufbrechen und RNA-bindende Proteine diese dann an einer erneuten Faltung hindern (Abbildung 19). (Guo & Bartel, 2016)

Sollten sich solche RNA G-Quadruplexe *in vivo* jedoch formieren, so stellten sie eine der stabilsten Strukturen dar, die das ribosomale Scannen der 5'-UTR blockiert. (Leppek et al., 2017) Eine solche Blockierung des ribosomalen Scanvorgangs wurde für einen potentiellen RG4 des Zinkfinger Proteins Zic-1 mit Hilfe eines Reportersystems *in vivo* beschrieben. (Arora et al., 2008)

INTERNAL RIBOSOMAL ENTRY SITE

Die virale *internal ribosome entry site* (IRES) gehört zu den am besten verstandenen regulatorischen RNA-Strukturen. Die Viren nutzen eine IRES als alternative Strategie um die Translation zu initiieren. Die IRES ermöglicht es den Viren, die Hemmung der Translationsinitiation bei einer Infektion der Wirtszelle zu umgehen. Doch auch einige zelluläre mRNAs verfügen über solche Sekundärstrukturen in ihrer 5'-UTR, die eine interne Rekrutierung der Ribosomen, Cap unabhängig, ermöglichen. Solche zellulären

IRES umgehen die Hemmung der Cap-abhängigen Translation durch Faktoren wie Stress, Mitose, Apoptose oder einer viralen Infektion der Zelle. (Leppek et al., 2017) Eine der ersten beschriebenen zellulären IRES, findet sich in der mRNA des Proteins BiP, das die schwere Kette des Immunglobulins bindet, und so auch bei einer Infektion mit Polioviren translatiert wird. (Macejak & Sarnow, 1991)

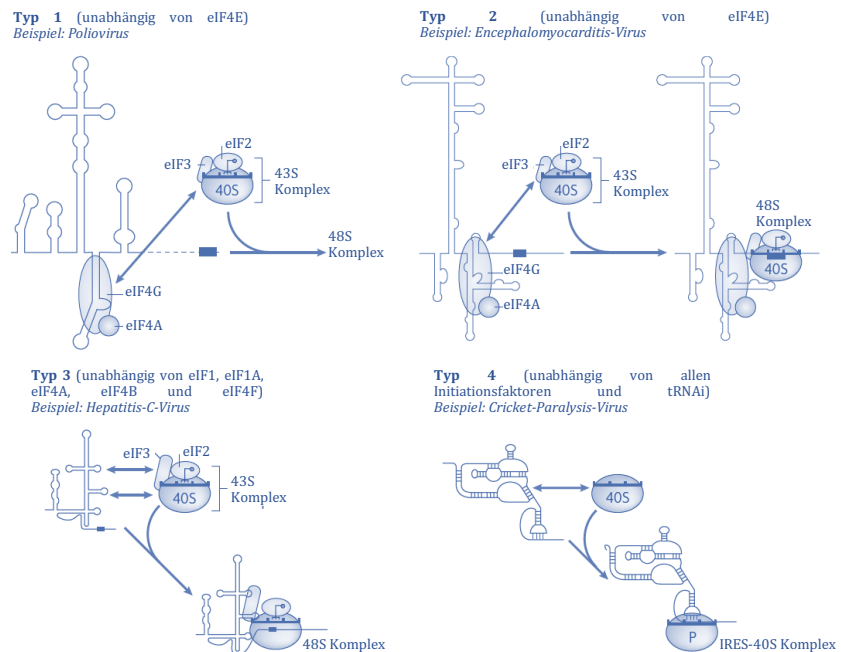


Abbildung 20: Übersicht viraler IRES-Typen (verändert nach: Jackson, T Hellen, & Pestova, 2010)

Die viralen IRES lassen sich in vier Gruppen einteilen (vgl. Abbildung 20), die sich neben ihrer Struktur auch im Umfang der Initiationsfaktoren unterscheiden, die für eine Rekrutierung der Ribosomen an die mRNA benötigt werden. (Jackson et al., 2010)

Es gibt die Auffassung, dass die Cap-abhängige Translationsinitiation, wie wir sie heute bei Eukaryoten hauptsächlich finden, evolutionär aus IRES-Elementen hervorgeht. (Hernández, 2008)

EUKARYOTISCHER TRANSLATIONS INITIATIONFAKTOR 4 A (EIF4A)

Der eukaryotische Translations Initiationsfaktor 4 A (eIF4A oder DDX2) ist eine RNA-Helikase der DEAD-Box Familie und gehört zur Superfamilie 2 der 5 Superfamilien, in die alle Helikasen eingeteilt werden. Namensgebend für diese Familie ist das konservierte Motiv der Aminosäuresequenz Asp-Glu-Ala-Asp (D E A D), das alle Helikasen dieser Familie teilen. (Hilbert, Karow, & Klostermeier, 2009)

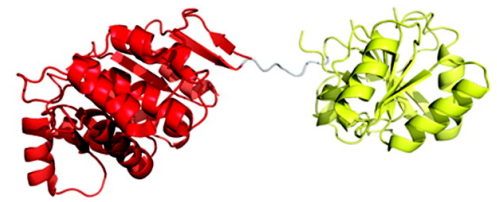


Abbildung 21: eIF4A ohne Ligand in der offenen Konformation (Andreou & Klostermeier, 2013)

ISOFORMEN

eIF4A kommt in drei Isoformen vor, eIF4AI-III. Die Isoformen I und II verfügen über eine Sequenzübereinstimmung von über 90 %. Die Isoformen I und II werden beide im Zytoplasma exprimiert, I in proliferierenden Zellen, II vermehrt in ruhenden. Die dritte Form eIF4AIII kommt ausschließlich im Nukleus vor und stimmt nur zu etwa 60 % mit der Sequenz der anderen Isoformen überein. Auch eine funktionelle Ähnlichkeit scheint nicht gegeben zu sein, so deutet nichts auf eine Verbindung zur Translationsinitiation hin, vielmehr ist eIF4AIII Teil des Exon-Junction-Komplexes (EJC) und damit beteiligt am pre-mRNA Splicing. Zwar ging man lange Zeit davon aus, dass I und II funktionell austauschbar seien, da eine Suppression von eIF4AI die Transkription von eIF4AII erhöht; doch zeigte sich, dass ein eIF4AI-defizienter Phänotyp nicht durch eIF4AII kompensiert werden kann. Die beiden zytoplasmatisch vorkommenden Isoformen von eIF4A sind also in ihrer Expression mit einander verbunden, scheinen sich aber funktionell zu unterscheiden. (Andreou & Klostermeier, 2013; Galicia-Vazquez, Cencic, Robert, Agenor, & Pelletier, 2012)

MECHANISMUS

ALLGEMEINER MECHANISMUS DER DEAD-BOX HELIKASEN

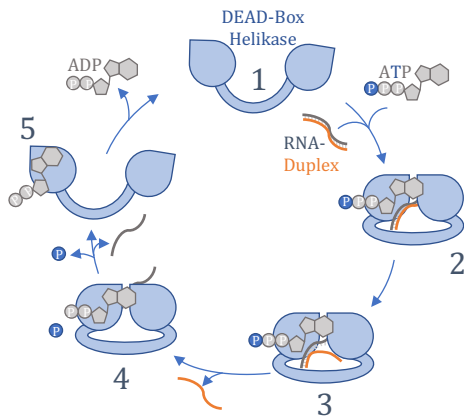


Abbildung 22: Konformationsänderungen von DEAD-Box Helikasen (verändert nach: Harms, Andreou, Gubaev, & Klostermeier, 2014)

Im Verlauf ihrer katalytischen Aktivität durchlaufen DEAD-Box Helikasen einen Kreislauf, während dessen sie zwei verschiedene Konformationen einnehmen, eine offene und eine geschlossene Konformation. Zunächst liegt die Helikase in offener Konformation, also gelöst und ohne Aktivität, vor (Abbildung 22 (1)) und wechselt durch Bindung von ATP und doppelsträngiger RNA in die geschlossene Konformation (2). Dann wird die RNA Duplexstruktur destabilisiert und der erste Strang freigesetzt (3). Unter Abspaltung einer Phosphatgruppe wird auch der zweite RNA-Strang freigesetzt (4) und es kommt erneut zur Konformationsänderung, zurück in die offene Form (5). Nach Abgabe des verbleibenden ADP-Moleküls kehrt das System in den Anfangszustand zurück.

MECHANISMUS VON EIF4A

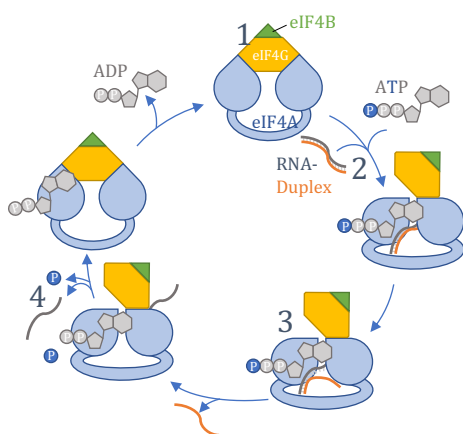


Abbildung 23: Konformationsänderung von eIF4A (verändert nach: Harms, Andreou, Gubaev, & Klostermeier, 2014)

Eine Besonderheit von eIF4A ist die Beteiligung weiterer Faktoren an diesem Prozess. Dies führt dazu, dass eIF4A drei Konformationen einnehmen kann. In Abwesenheit von Liganden nimmt eIF4A, wie alle anderen DEAD-Box Helikasen auch die nicht funktionelle Konformation an. Bindet jedoch der Faktor eIF4G an eIF4A, so nimmt diese eine halb-offene Konformation ein (Abbildung 23(1)). Dies verstärkt die ATPase Aktivität von eIF4A und begünstigt somit die Dissoziation des zweiten RNA-Strangs (4), die eigentliche Entwindung des RNA-Duplexes (3) ist hiervon jedoch nicht betroffen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist der Übergang von der halb-offenen in die geschlossene Konformation (2). Dieser Schritt wird durch den Faktor eIF4B beschleunigt, was zu einer 13-fach höheren Aktivität von eIF4A führt, im Vergleich zur Aktivität von eIF4A ohne die Faktoren eIF4B und eIF4G. (Harms, Andreou, Gubaev, & Klostermeier, 2014)

EIF4A ALS ZIEL IN DER ONKOLOGIE

Auch im onkogenen Kontext spielt eIF4A eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass bei einer Form der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL), der T-Zell ALL, die Onkogenese eIF4A abhängig ist. Dies soll auf eine vermutete RNA G-Quadruplex Struktur in einer onkogenen mRNA zurückzuführen sein. Eine spezifische Hemmung von eIF4A erzielte eine deutliche Reduktion des Tumorwachstums. (Wolfe et al., 2014)

CYCLOPENTA[*B*]BENZOFURANE

1982 konnten King et al. aus dem ethanolischen Extrakt der Wurzeln eines Mahagoniegewächses der Gattung *Aglaia*, genauer der Art *Aglaia elliptifolia*, der eine Wirksamkeit gegen Leukämizellen zeigte, Rocaglamid isolieren und strukturell aufklären. (Lu King et al., 1982) Damit wurde Rocaglamid als erstes Mitglied der Substanzklasse der Cyclopenta[*b*]benzofurane beschrieben; heute sind mehr als 100 Rocaglamidderivate als Naturstoffe isoliert und strukturell beschrieben. Sie stammen aus verschiedenen *Aglaia* Arten, die zur Familie der Meliaceae zählen.

BIOSYNTHESE

Durch Cycloaddition eines Flavonoid-Kerns mit einem Zimtsäureamid-Rest entsteht das Cyclopenta[*bc*]benzopyran Ringsystem als Hauptintermediat der Rocaglamidderivat-Biosynthese (vgl. Abbildung 24). Durch Umlagerung der einzelnen Ringe, unter anderem durch Ringöffnung und anschließende modifizierte Zyklisierung, entstehen Rocaglamidderivate mit verschiedenen Ringsystemen. Die Derivate lassen sich somit in drei Hauptgruppen unterteilen: i) Cyclopenta[*b*]benzofurane (Rocaglamide), ii) Cyclopenta[*bc*]benzopyrane (Thapsakine) und iii) Benzo[*b*]oxopine (Thapoxepine). Da die Cyclopenta[*b*]benzofurane eine ausgeprägte Wirksamkeit gegen Krebszellen zeigen, ist diese Gruppe von besonderem Interesse und vor allem die Derivate Silvestrol und Rocaglamid wurden intensiv im onkogenen Kontext untersucht. (Pan, Woodard, Lucas, Fuchs, & Douglas

Kinghorn, 2014; Proksch, Edrada, Ebel, Bohnenstengel, & Nugroho, 2001)

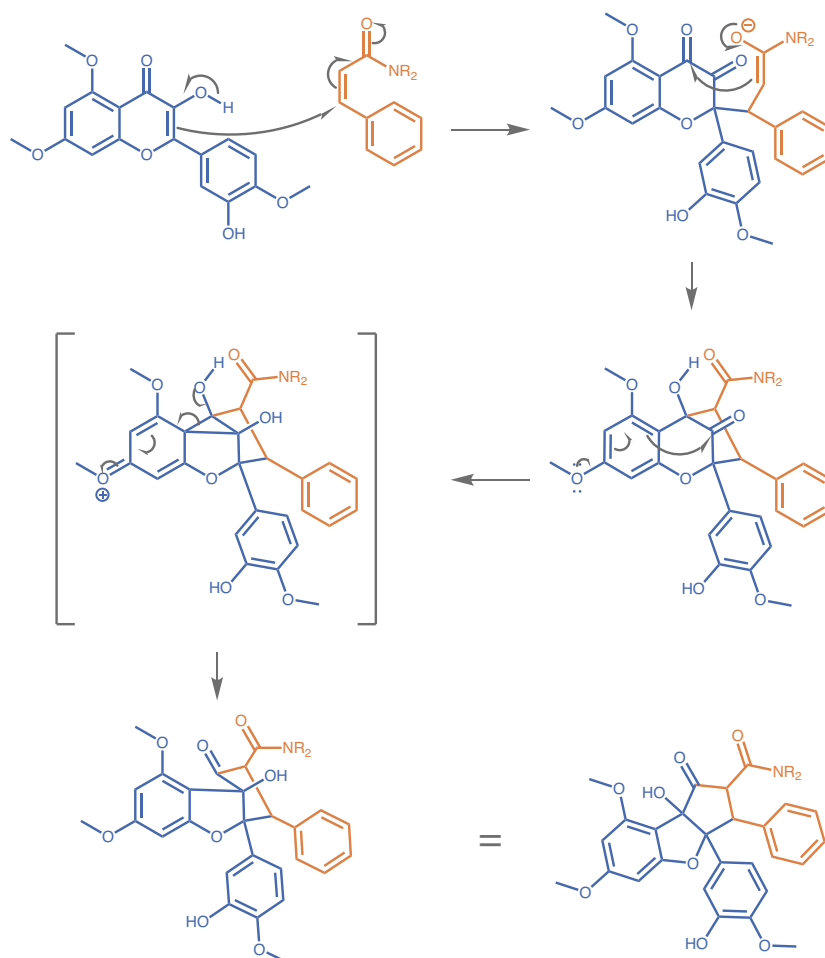


Abbildung 24: Biosynthese der Rocaglamide ausgehend von einem Flavonoid (blau) und einem Zimtsäureamid (orange) (verändert nach: Proksch, Edrada, Ebel, Bohnenstengel, & Nugroho, 2001)

SYNTHETISCHE DARSTELLUNG

Bereits 1991 wurde eine 8-stufige Synthese von racemischem Rocaglamid, ausgehend vom Benzofuran Intermediat, beschrieben. Wesentlich waren bei dieser Synthese eine intermolekulare Michael-Addition des Benzofurans mit *trans*-Zimtaldehyd und der Verwendung eines SmI_2 -Katalysators für die reduktive Zyklisierung des trizyklischen Rocaglamidkerns. (Davey, Schaeffer, & Taylor, 1991) Das Verfahren der synthetischen Darstellung von Rocaglamid wurde 10 Jahre später weiter verbessert (Dobler et al., 2001) und im Folgenden durch die Entwicklung einer biosynthetisch inspirierten Synthese mit enantioselektiver Photo-

zyklisierung noch weitergeführt (Baudouin Gerard, Sheharbano Sangji, Daniel J. O’Leary, & John A. Porco, 2006; Baudouin Gerard, Guilford Jones II, & John A. Porco, 2004). Darauf aufbauend konnte wenig später das Rocaglamid-Derivat Silvestrol (Abbildung 25 I) total-synthetisch dargestellt werden (Gerard, Cencic, Pelletier, & Porco, 2007; Pan et al., 2014).

SILVESTROL

Silvestrol ist ein Rocaglamid-Derivat, das aus den Früchten und Zweigen der Pflanze *Aglaia foveolata* isoliert werden kann. Es besitzt eine starke Wirkung gegen humane Krebszelllinien (Kim et al., 2007) und es konnte gezeigt werden, dass diese antitumorale Wirksamkeit von Silvestrol auf eine Hemmung der RNA-Helikase eIF4A1 zurückzuführen ist (Cencic et al., 2009).

MECHANISMUS

Eine verstärkte Wechselwirkung von eIF4A mit der RNA ist ursächlich für die Hemmung des Initiationsfaktors durch Silvestrol. Diese Wirkung zeigt sich abhängig von einer Cap-Struktur an der mRNA; gleichzeitig kann diese erhöhte Bindung einen Mangel an eIF4A als Bestandteil des eIF4F-Komplexes bedeuten und somit eine allgemeine Hemmung der cap-abhängigen Translation verursachen. Die inhibitorische Wirkung kann nur bei Cyclopenta[*b*]benzofuranen (Rocaglamiden) beobachtet werden; Cyclopenta[*bc*]benzopyrane und Benzo[*b*]oxopine weisen diese Eigenschaft nicht auf. (Cencic et al., 2009)

Eine transkriptomweite Untersuchung des Effekts von Silvestrol auf die Translationseffizienz hat gezeigt, dass die Bedeutung von eIF4A bei der Translationsinitiation sowohl mit einer überdurchschnittlichen Länge und Sekundärstruktur als auch einem vergleichsweise geringen prozentualen GC-Gehalt der entsprechenden 5'-UTRs korreliert. Obwohl es nach der Behandlung, auf das gesamte Genom gesehen, keine signifikante Reduktion der Translation gibt, zeigen von über 8000 untersuchten

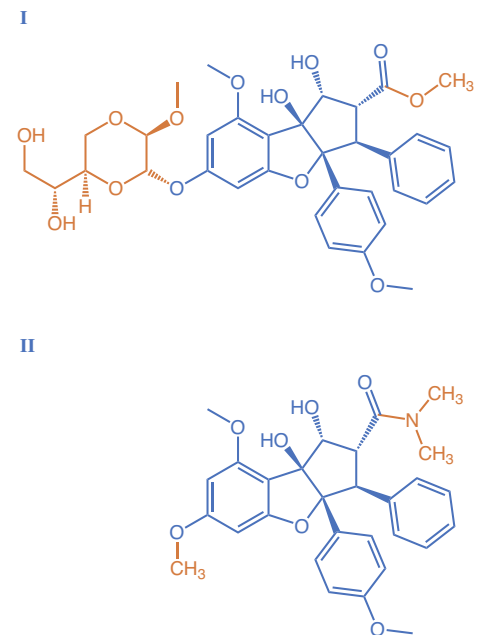


Abbildung 25: Strukturformeln Rocaglamide
I) Silvestrol, II) Rocaglamid (Unterschiede orange hervorgehoben)

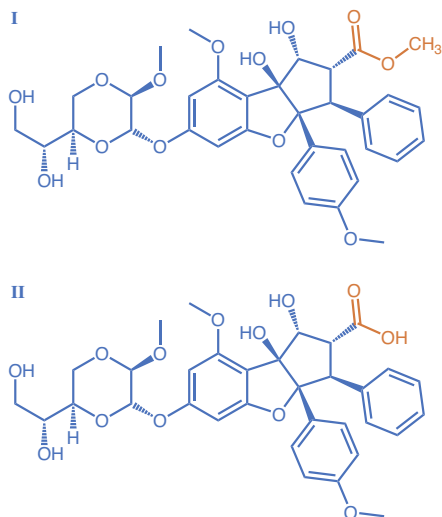


Abbildung 26: Strukturformeln Silvestrol und Silvestrolsäure (Ester und Säure orange hervorgehoben)

Genen, etwa 280 eine deutliche Abhängigkeit von der Helikase-Aktivität des Initiationsfaktors 4A. (Rubio et al., 2014)

PHARMAKOKINETIK

Silvestrol (Abbildung 26 I) zeigt in Mäusen sowohl nach intravenöser als auch nach intraperitonealer Gabe eine 100 % Bioverfügbarkeit, nach peroraler Gabe liegt diese jedoch nur bei 1,7 %. Der Hauptmetabolit scheint die inaktive Silvestrolsäure (II) zu sein. Sowohl in murinem, wie humanem Plasma können 6 Stunden nach Applikation noch etwa 60 % der ursprünglichen Plasmakonzentration nachgewiesen werden. Lediglich bei Ratten wird bereits nach 10 Minuten eine vollständige Metabolisierung zur Silvestrolsäure beobachtet, was auf spezifische Esterasen im Plasma von Ratten hindeutet. (Saradhi et al., 2011)

MATERIAL UND METHODEN

ZELLKULTUR

ALLGEMEINES

Experimente in der Zellkultur sind sehr empfindlich in Bezug auf Kontaminationen der Zellen mit Bakterien. Da der experimentelle Aufbau der durchgeführten Versuche den Einsatz von Antibiotika ausschließt, ist es unerlässlich möglichst sterile Bedingungen aufrecht zu erhalten. Hierzu werden alle Arbeiten mit den eukaryotischen Zellen in einer Reinluftwerkbank (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) durchgeführt. Die Zellen werden bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank (NuAire, Plymouth, USA) mit befeuchteter Atmosphäre kultiviert.

BESTIMMUNG DER ZELLZAHL

Die Zahl der Zellen pro Milliliter wird mit Hilfe einer Neubauerzählkammer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) unter dem Lichtmikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Hierzu werden 10 µL der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen einer Trypanblau-Lösung 0,4 % (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) versetzt und anschließend ausgezählt. Die Berechnung erfolgt mit nachfolgender Formel.

$$Z \cdot VF \cdot K = \text{Zellen pro Milliliter}$$

Formel 1. Berechnung der Zellzahl. (Z = gezählte lebende Zellen, VF = Verdünnungsfaktor, K = Kammerfaktor)

TRANSFEKTION

Das Einbringen fremder DNA oder RNA in eine eukaryotische Zelle wird als Transfektion bezeichnet. Es werden dabei transiente und stabile Transfektionen unterschieden. Die hier beschriebene Methode, mittels Lipofectamin™ 2000 (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA), dient der transienten Transfektion.

PLASMIDE

Für die Transfektion von Plasmiden werden $2 \cdot 10^4$ Zellen (Krebszelllinien) pro Well ausgesät und 24 Stunden in 200 μL des entsprechenden Mediums inkubiert (37°C , 5 % CO_2). Am Folgetag wird die eigentliche Transfektion durchgeführt. Hierzu wird das Minimalmedium Opti-MEM™ | Reduced Serum Media (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) verwendet und dieses findet auch für alle Verdünnungen Anwendung. Zunächst wird in den zu behandelnden Wells das Medium vorsichtig abgesaugt und durch 100 μL Minimalmedium ersetzt. Anschließend wird eine Lipofectamin-Plasmid-Lösung vorbereitet. Diese Lösung setzt sich zu gleichen Teilen aus einer Lösung von 500 ng/ μL Plasmid-DNA und einer Lösung 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Lipofectamin™ 2000 zusammen (entspricht 100 ng DNA und 0,2 μL Lipofectamin™ 2000 pro Well). Bevor in jedes Well 10 μL dieser Lipofectamin-Plasmid-Lösung pipettiert wird, muss die Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Wenn die Behandlung aller Wells abgeschlossen ist, werden die Zellen für vier bis fünf Stunden im Brutschrank inkubiert (37°C , 5 % CO_2). Im Anschluss kann zusammen mit einem Wechsel des Medium zurück zum jeweiligen Standardmedium eine Behandlung der Zellen im Rahmen der Experimente erfolgen.

SIRNA

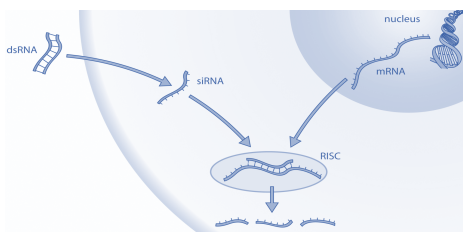


Abbildung 27: Übersicht RNA-Interferenz.
(verändert nach: Robinson *et al.*, 2004)

siRNAs sind einzel- oder doppelsträngige RNAs von etwa 19 bis 23 Basenpaaren Länge. Sie kodieren selbst nicht für Proteine können aber zum Abbau von Protein kodierende einzelsträngige RNAs führen. siRNAs sind Bestandteil des so genannten RNA-induced silencing complexes (RISC), und damit ein wichtiger Bestandteil der RNA-Interferenz. Hierunter versteht man einen Mechanismus bei Eukaryoten, der die spezifische Stilllegung von Genen ermöglicht, indem bestimmte mRNAs abgebaut werden.

Der Einsatz von siRNAs kann auch in der Forschung genutzt werden, um gezielt dem Knockdown von Genen mittels RNA-Interferenz zu erreichen. Die Transfektion der siRNA geschieht analog zu der von Plasmid-DNA. Es werden jedoch 0,3 µL Lipofectamin™ 2000 pro Well und 1 nM siRNA eingesetzt.

KREBSZELLINIEN

SUBKULTIVIERUNG VON ZELLEN

Um eine, der Zelllinie angepasste, Zelldichte zu gewährleisten, werden die Zellen zweimal die Woche passagiert. Hierzu werden die adhärennten Zellen zunächst mit PBS gewaschen um Zelltrümmer und Stoffwechselprodukte zu entfernen. Anschließend werden die Zellen mit Trypsin/EDTA Lösung (0,25 % (w/v) Trypsin, 0,53 mM EDTA) 5 Minuten lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um sie von der Oberfläche der Zellkulturflasche abzulösen. Die abgelösten Zellen werden im gleichen Volumen Medium aufgenommen und für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt worden ist, wird das Zellpellet im entsprechenden Medium resuspendiert und ein Teil der Suspension in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt. Die verwendeten Medien und Kultivierungsbedingungen, sind den jeweiligen Bedürfnissen der Zelllinie angepasst.

HEPG2

Die Zelllinie HepG2 stammt aus dem Leberzellkarzinom eines 15-jährigen kaukasischen Jungen. (vgl. Aden et al. 1979)

Die Zellen sind adhärennt und werden in *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) mit 10 % *fetal bovine serum* (FCS) kultiviert.

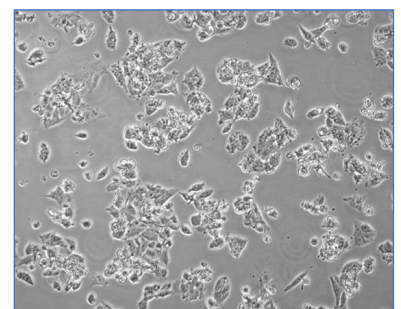


Abbildung 28: Mikroskopische Ansicht von HepG2 Zellen. (verändert nach: ATCC)

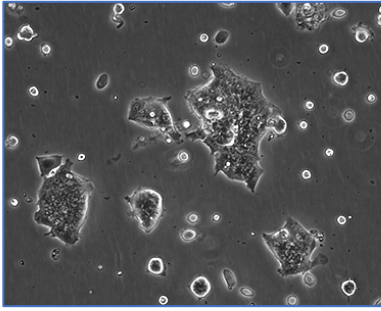


Abbildung 29: Mikroskopische Ansicht von LS174T Zellen. (verändert nach: ATCC)

LS174T

Bei der Zelllinie LS174T handelt es sich um Zellen des Kolonkarzinoms einer 58-jährigen kaukasischen Frau. (vgl. ATCC n.d.)

Die Zellen sind adhärent und werden in IMDM mit 10 % FCS kultiviert.

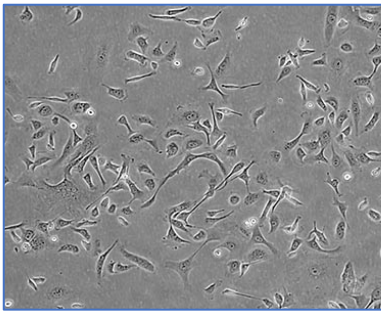


Abbildung 30: Mikroskopische Ansicht von Skov3 Zellen. (verändert nach: ATCC)

SKOV3

Diese Zelllinie entstammt einem ovariellen Adenokarzinom einer 64-jährigen kaukasischen Frau. (vgl. ATCC n.d.)

Die Zellen sind adhärent und werden in IMDM mit 10 % FCS kultiviert.

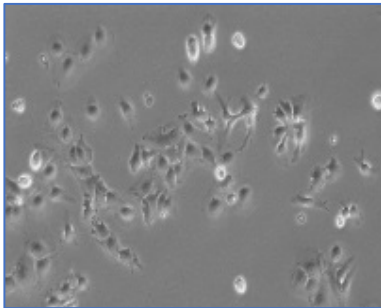


Abbildung 31: Mikroskopische Ansicht von HUH7 Zellen. (verändert nach: CLS Cell Lines Service GmbH, 2018)

HUH7

Die Zelllinie wurde aus dem Leberzellkarzinom eines 57-jährigen japanischen Mannes entnommen. (vgl. Nakabayashi et al. 1982)

Die Zellen sind adhärent und werden im Medium *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640) mit 10 % FCS kultiviert.

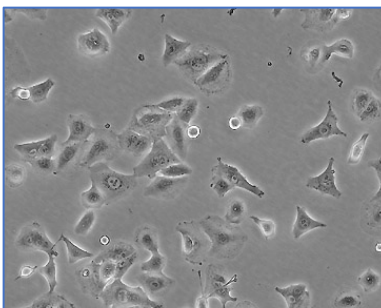


Abbildung 32: Mikroskopische Ansicht von A549 Zellen. (verändert nach: ATCC)

A549

Aus dem Lungenkarzinom eines 58-jährigen kaukasischen Mannes wurde diese Zelllinie isoliert. (vgl. Giard et al. 1973)

Die Zellen sind adhärent und werden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10 % FCS kultiviert.

PRIMÄRE ZELLEN

Die Primärzellen werden aus dem Leukozytenfilm, dem sogenannten Buffy-Coat, gewonnen. Dieser wird nach vorheriger schriftlicher Anforderung von der Blutbank des Universitätsklinikums Gießen und Marburg bezogen. Um die spenderbedingten Schwankungen auszugleichen, werden die gewonnenen mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) mehrerer Spender gepoolt.

ISOLATION VON PBMCs

Die Isolation der PBMCs aus den Buffy-Coats erfolgt mittels Ficoll-Gradient. Hierzu werden in einem 50 mL Schraubröhre (Sarstedt AG&Co, Nürnberg, Deutschland) zunächst 20 mL Ficoll (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norwegen) mit 25 mL Buffycoat überschichtet. Dabei dürfen sich die Phasen nicht vermischen. Es folgt eine Zentrifugation (800g, 20°C, 20 Minuten) mit ausgeschalteter Bremse. Der entstandene weiße Leukozyten-Ring wird nun abgenommen und in einer frischen 50 mL Schraubröhre mit 50 mL PBS (Lonza Ltd., Basel, Schweiz) resuspendiert und dann zentrifugiert (500g, 4°C, 8 Minuten). Der Überstand wird abgesaugt.

Sollen die PBMCs im Anschluss nicht weiter aufgereinigt werden, so folgt ein zweiter Waschschriff mit 50 mL gekühltem PBS. Nach einer weiteren Zentrifugation (300g, 4°C, 8 Minuten) wird der Überstand erneut abgenommen und die Zellen können, in RPMI 1640 mit 300 mg/L L-Glutamin (Lonza Ltd., Basel, Schweiz) resuspendiert und auf die gewünschte Zelldichte eingestellt, kultiviert werden.

Folgt an die Isolation der PBMCs eine Aufreinigung der Monozyten über CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland), so werden die Zellen nun in MACS Puffer (0,5 % FCS, 0,2 mM EDTA in PBS) resuspendiert. Nach der Zentrifugation (300g, 4°C, 8 Minuten) wird der Überstand abgenommen und die

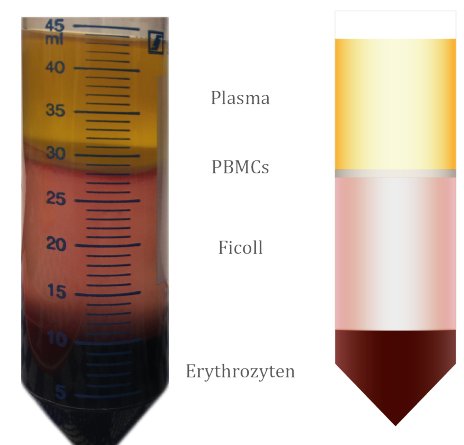


Abbildung 33: Ficollgradient, Fraktionen nach Zentrifugation

Zellen in 10 mL kaltem MACS Puffer resuspendiert. Die Menge der erhaltenen PBMCs wird in einer Neubauerzählkammer nach Anfärben mit Trypanblau-Lösung 0,4 % (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) bestimmt.

MONOZYTEN AUFREINIGUNG

Die Aufreinigung der Monozyten aus den isolierten PBMCs wird mit CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt. Die PBMCs werden für 10 Minuten bei 300g zentrifugiert und in MACS Puffer resuspendiert (10^7 Zellen in 80 µL Puffer). Zu der Zellsuspension werden die CD14 MicroBeads (20 µL pro 10^7 Zellen) zugegeben und gründlich gemischt, dann 15 Minuten bei 2-8°C inkubiert. Es folgt ein Waschschrift mit 1-2 mL MACS Puffer pro 10^7 Zellen und 10 Minuten Zentrifugation bei 300g. Der Überstand wird verworfen. Es können bis zu 10^8 Zellen in 500 µL MACS Puffer resuspendiert werden. In den MACS Separator (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) wird die passende MACS Column (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) eingespannt und mit 3 mL kaltem MACS Puffer equilibriert, ehe die Zellsuspension auf die MACS Column aufgebracht wird. Der Durchfluss wird verworfen und die MACS Column dreimal mit 3 mL kaltem MACS Puffer gewaschen. Nun wird die MACS Column aus dem MACS Separator entnommen und die Monozyten mit 5 mL kaltem MACS Puffer in ein 15 mL Schraubröhre eluiert. Mit Hilfe einer Neubauerzählkammer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) wird die erhaltene Zellzahl unter dem Lichtmikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) bestimmt.

MONOZYTEN DIFFERENZIERUNG

Die zuvor isolierten Monozyten werden zu Makrophagen des proinflammatorischen Phänotyps M1 differenziert, indem diese dem Glykoprotein GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor) ausgesetzt werden. (vgl. Leidi et al. 2009)

Es werden $8 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in 100 μ L RPMI 1640 mit 300 mg/L L-Glutamin (Lonza Ltd., Basel, Schweiz) ausgesät. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wird jedes Well mit 100 μ L 2X Serum-Faktor-Mix (4 % defibriniertem off-the-clot Humanserum AB (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) und 20 ng/mL GM-CSF (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) in RPMI 1640 mit 300 mg/L L-Glutamin) substituiert. Nach 72 Stunden Inkubation (37°C, 5 % CO₂) wird ein halber Mediumwechsel durchgeführt. Hierzu werden 100 μ L Medium abgenommen und durch 100 μ L frisches Medium ersetzt (4 % defibriniertem off-the-clot Humanserum AB in RPMI 1640 mit 300 mg/L L-Glutamin). Weitere 96 Stunden später sind die Monozyten weitgehend zu Makrophagen differenziert und können entsprechend dem Versuchsaufbau mit Silvestrol bzw. DMSO behandelt werden. Hierzu wird das gesamte Medium abgesaugt und durch frisches Medium (RPMI 1640 mit 300 mg/L L-Glutamin und 2 % defibriniertem off-the-clot Humanserum AB) ersetzt, welches mit Silvestrol oder DMSO in entsprechender Konzentration versetzt ist.

TOXIZITÄTS-ASSAYS

WST-ASSAY

Zur Bestimmung der Zellproliferation werden bei diesem Assay die Zellen einem wasserlöslichen Tetrazoliumsalz ausgesetzt. Dieses wird in intakten Zellen durch zelleigene Dehydrogenasen in den dunkelroten Farbstoff Formazan umgesetzt. Die Auswertung erfolgt durch Messung der Absorption. (Yin, Wei, Wang, Xu, & Yang, 2013)

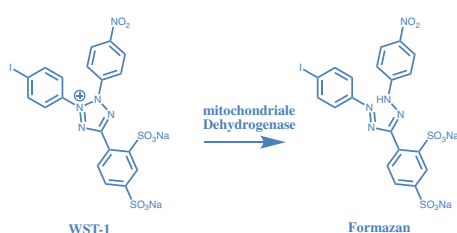


Abbildung 34: Reaktionsgleichung WST

Für den Assay werden $1,4 \cdot 10^4$ Zellen (Krebszelllinien) pro Well in transparenten 96 Well Zellkulturplatten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und 24 Stunden in 200 μL des entsprechenden Mediums inkubiert (37°C , 5 % CO_2), wobei das Vorgehen bei Makrophagen abweicht (vgl. *Monozyten Differenzierung*). Dann werden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen behandelt und weiter inkubiert. Am Ende der Behandlung wird das Medium abgenommen und die Zellen vorsichtig mit PBS (37°C) gewaschen. Jedes zu untersuchende Well wird mit 110 μL einer Lösung (10:1) von PBS und Cell Proliferation Reagent WST-1 (Merck, Darmstadt, Deutschland) überschichtet und für etwa 3 Stunden weiter inkubiert (37°C , 5 % CO_2). Die Messung der Absorption wird am Safire2™ (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm durchgeführt.

APOPTOSE-ASSAY

Die Apoptose wird anhand der Caspase-3 und Caspase-7 Aktivität mit Hilfe des Caspase-Glo® 3/7 Assays (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) über eine Lumineszenz Reaktion durchgeführt. In eine schwarze 96 Well Zellkulturplatten mit transparentem Boden (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) werden $1,4 \cdot 10^4$ Zellen (Krebszelllinien) bzw. $8 \cdot 10^5$ (primäre Zellen) pro Well ausgesät und zunächst für 24 Stunden inkubiert (37°C , 5 % CO_2). Im Anschluss werden die Zellen entsprechend der Frage-

stellung behandelt und weiter inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Nach der Inkubation wird das Medium vorsichtig, aber restlos abgesaugt und durch jeweils 50 µL frisches Medium (Raumtemperatur) ersetzt. Außerdem werden in jedes Well 50 µL des nach Herstellerangaben vorbereiteten Reagenzes (ebenfalls Raumtemperatur) zugegeben und durch viermaliges Auf- und Abpipettieren sorgfältig gemischt. Zu den eigentlichen Proben werden zusätzlich weitere Wells, ohne Zellen, in gleicher Weise behandelt und als Blindprobe vermessen. Die Messung der Lumineszenz erfolgt am Safire2™ (Tecan, Crailsheim, Deutschland).

KOMBINIERTER APOPTOSE- UND VIABILITÄTS- UND ZYTOTOXIZITÄTS-ASSAY

Der ApoTox-Glo™ Triplex Assay (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) ermöglicht die Bestimmung aller drei Parameter in einem Well. In einer schwarzen 96 Well Zellkulturplatte mit transparentem Boden (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) werden 1·10⁴ Zellen pro Well in 100 µL Medium ausgesät und für 24 Stunden inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Anschließend erfolgt die Behandlung der Zellen und eine weitere Inkubation, bei gleichen Bedingungen für 48 Stunden. In jedes Well werden 20 µl des Viability/ Cytotoxicity Reagenz gegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt, dann bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und die Fluoreszenz am Safire2™ (Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Die Viabilität wird bei 400_{Ex}/505_{Em}, die Zytotoxizität bei 485_{Ex}/520_{Em} bestimmt. Im Anschluss werden 100 µL Caspase-Glo® 3/7 Reagenz zugegeben und die Zellkulturplatte für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt die Lumineszenz Messung der Caspase-3 und Caspase-7 Aktivität am Safire2™ (Tecan, Crailsheim, Deutschland).

LANGZEIT ZELLVIABILITÄTS-MESSUNG

Um über einen längeren Zeitraum die zytotoxische Wirkung einer Substanz auf dieselbe Zellpopulation beobachten zu können, wird mit Hilfe des RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assays (Promega

GmbH, Mannheim, Deutschland) über mehrere Tage die Zellviabilität beobachtet.

Hierzu werden gemäß den Herstellerangaben das MT Cell Viability Substrat und die NanoLuc®-Luciferase zu den behandelten Zellen gegeben. Entsprechend der Zellviabilität wird das zugesetzt MT Cell Viability Substrat in der Zelle reduziert und anschließend wieder in den extrazellulären Raum ausgeschieden, wo es der Luciferase als Substrat dient. Die Viabilität ist proportional zur Luciferaseaktivität und durch die Bestimmung der Lumineszenz mit dem Safire2™ (Tecan, Crailsheim, Deutschland) zu unterschiedlichen Zeiten kann diese gemessen werden.

BESTIMMUNG DER TRANSLATIONSEFFIZIENZ

DUAL-LUCIFERASE-ASSAY

Mit dem Dual-Luciferase-Assay wird sowohl die Wirkung verschiedener Substanzen auf die Translationeffizienz, als auch die Abhängigkeit verschiedene 5'-UTRs von der Helikase eIF4A untersucht. Hierzu werden in HepG2 Zellen Plasmide transfiziert, die zwei verschiedene Luciferasen kodieren. Zum einen die Renilla-Luciferase, deren Translation über eine eIF4A unabhängige HCV-IRES reguliert wird, und als Transfektionskontrolle dient. Zum anderen kodieren die Plasmide eine Firefly-Luciferase, der 5' zum Startcodon die zu untersuchenden 5'-UTR vorangestellt ist. Nach der Transfektion erfolgt die Behandlung der Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen oder Silvestrol als einem bekannten

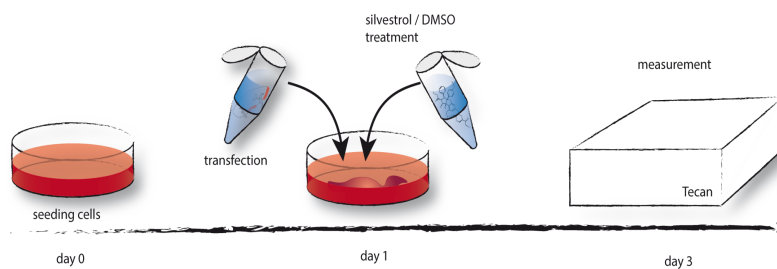


Abbildung 35: Ablauf des Dual-Luciferase-Assay.

eIF4A-Inhibitor.

In eine schwarze 96 Well Zellkulturplatten mit transparentem Boden (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) werden $1,4 \cdot 10^4$ HepG2-Zellen pro Well ausgesät und zunächst für 24 Stunden inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Am folgenden Tag werden die Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (vgl. *Transfektion*) und mit den zu untersuchenden Substanzen in entsprechenden Konzentrationen behandelt. Als Kontrolle werden die Zellen mit DMSO behandelt um im Anschluss auf diese normalisieren zu können. Nach 48 Stunden Inkubation (37°C, 5 % CO₂) erfolgt die Messung der Luciferaseaktivitäten. Hierzu wird das Dual-Luciferase Reporter® Assay System (Promega GmbH, Mannheim,

Deutschland) verwendet. Die Durchführung erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers, die Messung der Lumineszenz wird am Safire2™ (Tecan, Crailsheim, Deutschland) durchgeführt.

ERWEITERTER DUAL-LUCIFERASE-ASSAY

Um die Abhängigkeit der Wirkung auf die Translationseffizienz von eIF4A zu prüfen, wird diese Helikase durch siRNA gezielt ausgeschaltet. Als Kontrolle dient eine unspezifische siRNA, die keinen Effekt in den Zellen zeigt.

Die Durchführung des erweiterten Dual-Luciferase-Assays entspricht der des einfachen (vgl. *Dual-Luciferase-Assay*), jedoch werden neben der Plasmid-DNA parallel 1 nM siRNA transfiziert (vgl. *siRNA*).

HELIKASE-ASSAY

Die Durchführung des Helikase-Assays orientiert sich an den Protokollen aus zwei Veröffentlichungen (Cencic, Galicia-Vázquez, & Pelletier, 2012; Rogers, Richter, & Merrick, 1999). Da in der Arbeit der begonnene Entwicklungsprozess der Methode beschrieben wird, kann hier nur beispielhaft eine getestete Variante, stellvertretend für die diversen im Ergebnisteil vorgestellten Tests, dargestellt werden.

Zunächst werden ein MasterMix und ein EnzymMix hergestellt (vgl. Tabelle 1 und Tabelle 2).

Tabelle 1: MasterMix für Helikase-Assay

	1X
<i>10X Helikase Assay Puffer (HAP)</i>	1 µL
<i>BSA 20 mg/mL</i>	0,5 µL
<i>ATP 100 mM</i>	0,1 µL
<i>³²P-markierte DNA Sonde</i>	8.000 cpm
<i>RNA Templat (29,17 µM)</i>	0,07 µL
<i>ddH₂O</i>	ad 5 µL

Tabelle 2: EnzymMix für Helikase-Assay

	1X
<i>eIF4A1</i>	0,55 µL
<i>eIF4B</i>	0,3 µL
<i>eIF4G</i>	1,8 µL
<i>ddH₂O</i>	ad 4 µL

Die vorbereiten Ansätze werden dann mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors (z.B. Silvestrol) versetzt und nach entsprechender Inkubation die Reaktion mit Hilfe eines 3X StopPuffers die Reaktion abgestoppt. Anschließend werden die Ansätze auf ein natives PAA-Gel aufgetragen, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und ausgewertet.

Tabelle 3: Beispielansatz eines Helikase-Assays

	Positiv Kontrolle	Negativ Kontrolle	0 nM Silvestrol	1 nM Silvestrol	5 nM Silvestrol	10 nM Silvestrol	20 nM Silvestrol
<i>MasterMix A</i>	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
<i>ddH₂O</i>	5 µL	5 µL	1 µL	-	-	-	-
<i>Silvestrol 10 nM</i>	-	-	-	1 µL	-	-	-
<i>Silvestrol 50 nM</i>	-	-	-	-	1 µL	-	-
<i>Silvestrol 100 nM</i>	-	-	-	-	-	1 µL	-
<i>Silvestrol 200 nM</i>	-	-	-	-	-	-	1 µL
	70 °C (- 5 °C, 2 min) 13x, 4 °C hold	auf Eis					
<i>EnzymeMix</i>	-	-	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL
	4 °C hold	20 °C, 15 min					
<i>StopPuffer 3X</i>	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL

NUKLEINSÄURE METHODEN

GELELEKTROPHORESE

Das Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren bedingt deren negative Ladung, welche daher proportional zur Länge der Nukleinsäure ist. Dies wird genutzt um DNA und RNA nach ihrer Länge aufzutrennen. Unterschiedlich lange Nukleinsäuren bewegen sich unterschiedlich schnell durch eine Gelmatrix in einem elektrischen Feld. Diese Gelmatrix kann sowohl mit Hilfe von Agarose oder Polyacrylamid gebildet werden.

AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Das Gel kann je nach der gewünschten Auftrennung mit Konzentrationen von 0,5 % bis zu 4 % (m/V) Agarose (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gegossen werden. Hierzu wird die entsprechende Menge Agarose mit TBE-Puffer (mit entionisiertem Wasser aus 10X TBE (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)) in der Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt und nach kurzem Abkühlen mit 0,1 µL/mL GelRed® (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) für die spätere Detektion unter UV-Licht versetzt. Dann wird das Gel in der gewünschten Größe gegossen und die Proben mit Orange DNA Loading Dye versetzt aufgetragen. Die Agarose-Gelelektrophorese wird horizontal in TBE-Puffer bei konstanten 120 mA durchgeführt und anschließend unter UV-Licht ausgewertet.

POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Die Gelelektrophorese mit Polyacrylamid (PAA) Gelen wird bei kleinen Nukleinsäure Fragmenten eingesetzt. Sie kann sowohl nativ als auch denaturierend, also unter Zusatz von Harnstoff, durchgeführt werden. Die Gele werden zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch Plastikstreifen voneinander getrennt sind, wobei die Dicke dieser Plastikstreifen die später Dicke der Gele

definiert. Die Gelmatrix selbst entsteht durch eine radikalische Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid. Durch deren Konzentrationsverhältnis untereinander und der eingesetzten Endkonzentration von beiden Bestandteilen im Ansatz, wird die Porengröße und damit die Trenneigenschaft des Gels bestimmt. Um die Reaktion zu starten, wird der Radikalstarter Ammoniumperoxodisulfat und der Polymerisierungskatalysator Tetramethylethyldiamin zugesetzt.

Tabelle 5: Zusammensetzung PAA-Lösungen

	<i>Harnstoff 8M</i>	<i>20 % PAA-Lösung (denaturierend)</i>	<i>20 % PAA-Lösung (nativ)</i>
<i>Harnstoff</i>	480 g	480 g	-
<i>10X TBE-Puffer</i>	100 mL	100 mL	100 mL
<i>Acrylamid/Bisacrylamid (24:1) 50 %</i>	-	400 mL	400 mL
<i>ddH₂O</i>	ad 1000 mL	ad 1000 mL	ad 1000 mL

Die PAA Konzentration variiert nach der Länge der zu untersuchenden Nukleinsäuren. Um die Polymerisationsreaktion zu starten, werden dem Ansatz 0,01 Teile einer Ammoniumperoxodisulfat-Lösung 10 % (aus APS, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und 0,1 Teile Tetramethylethyldiamin (TEMED, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt. Nach dem Gießen der Gele dauert es etwa 30 Minuten bis diese ausgehärtet sind.

Die Gelelektrophorese wird vertikal durchgeführt und als Laufpuffer 1X TBE (aus 10X TBE mit entionisiertem Wasser) verwendet. Die Proben werden mit Probenpuffer (Tabelle 4) im Verhältnis 1:1 auf das Gel aufgetragen und werden dann elektrophoresiert. Das Laufverhalten kann über die Komigration (Tabelle 6) der beiden Farbstoffe Bromphenolblau (BPB) und Xylencyanolblau (XCB) abgeschätzt und die Einstellungen entsprechend angepasst werden.

Zur Detektion werden die Nukleinsäuren entweder mit ³²P radioaktiv markiert (vgl. radioaktive 5'-Endmarkierung) und dann mit

Tabelle 4: Zusammensetzung Probenpuffer

<i>2X Probenpuffer (denaturierend)</i>	
<i>Harnstoff</i>	15,62 g
<i>Formamid</i>	66 mL
<i>Glycerin</i>	-
<i>Bromphenolblau</i>	20 mg
<i>Xylencyanolblau</i>	20 mg
<i>10X TBE</i>	20 mL
<i>ddH₂O</i>	ad 100 mL

Tabelle 6: Komigrationsverhalten von BPB und XCB. (verändert nach: Gürgelsiepe and Hartmann, 2005)

<i>Acrylamid</i>	<i>BPB</i>	<i>XCB</i>
5 %	35 nt	130 nt
6 %	26 nt	106 nt
8 %	19 nt	75 nt
10 %	12 nt	55 nt
20 %	8 nt	28 nt

Hilfe von Röntgenspeicherfolien und eines Phosphorimagers ausgewertet oder sie werden mit einem interkalierenden Farbstoff wie Ethidiumbromid (CarlRoth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) oder GelRed® (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) angefärbt und unter UV-Licht ausgewertet werden.

NUKLEINSÄUREAUFREINIGUNG

RNA-AUFREINIGUNG

RNA aus eukaryotischen Zellen wird mit dem Kit NucleoSpin® miRNA (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) entsprechend den Herstelleranweisungen isoliert. Nach der Lyse der Zellen mit dem ML Puffer (Bestandteil des NucleoSpin® miRNA Kits) können die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren für bis zu einem Jahr bei -80 °C gelagert werden, bevor sie weiterverarbeitet werden.

Mit Hilfe des Kits können kleine (<200 nt) und große (>200 nt) RNAs entweder in getrennten Fraktionen aufgereinigt werden oder zusammen in einer. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente werden kleine und große RNAs immer in einer Fraktion gemeinsam aufgereinigt.

DNA-AUFREINIGUNG

GELAUFREINIGUNG

Um DNA aufzureinigen, wird zunächst eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (vgl. *Agarose-Gelelektrophorese*). Im Anschluss wird die Bande mit dem gesuchten DNA-Fragment mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, wobei die UV-Exposition so gering wie möglich zu halten ist. Die DNA wird dann entsprechend den jeweiligen Herstelleranweisungen mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) oder dem Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland) aus dem Gel eluiert und weiter aufgereinigt.

SÄULCHENAUFREINIGUNG

Wenn nicht die Aufreinigung eines definierten DNA-Fragments notwendig ist, wird die Aufreinigung mit Hilfe des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) entsprechend dem Herstellerprotokoll über Säulchen durchgeführt.

PLASMID-PRÄPARATION

Zur Gewinnung von Plasmid DNA, werden E. coli DH5α mittels Hitzeschock mit dem betreffenden Plasmid transformiert (vgl.

Transformation).

Aus 5 mL Übernachtskulturen (LB Medium mit 100 µg/mL Ampicillin) wird dann die Plasmid DNA mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) nach Herstellerprotokoll isoliert.

KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird photometrisch bestimmt. Hierzu werden 2 µL der zu untersuchenden Lösung am UV5 Nano-Spektrometer (Mettler-Toledo International Inc., Greifensee, Schweiz) aufgetragen und die Absorption gemessen. Als Nullabgleich dient das jeweilige Lösungsmittel, in dem die Nukleinsäure gelöst ist. Das Gerät zeichnet die Absorption über den Wellenlängenbereich von 190 bis 1100 nm auf. Das so erhaltene Absorptionsspektrum ermöglicht neben der Bestimmung der Konzentration auch eine Aussage über die Qualität der Aufreinigung.

Die drei entscheidenden Absorptionen bei dieser Aufgabenstellung sind die bei 260 nm, bei den Nukleinsäuren absorbieren, 280 nm für Proteinen und die Absorption bei 230 nm lässt Rückschlüsse über Verunreinigungen mit Zuckern, Salzen und Chemikalien wie Phenol zu. Die Qualität der Aufreinigung wird über deren Verhältnis zu einander ausgedrückt. So sollte das Verhältnis

260 nm zu 280 nm zwischen 1,8 und 2 liegen, das von 260 nm zu 280 nm bei >2.

RNA

Die Berechnung der Konzentration leitet sich vom Lambert-Beerschen Gesetz ab und erfolgt nach der folgenden Formel. Als Korrekturfaktor für RNA ist 40 ng/μL.

$$c \left[\frac{ng}{\mu L} \right] = A_{260 \text{ nm}} \cdot V \cdot 40 \left[\frac{ng}{\mu L} \right]$$

Formel 2. Berechnung der RNA-Konzentration. c= Konzentration, $A_{260 \text{ nm}}$ = Absorption bei 260 nm, V= Verdünnungsfaktor

DNA

Die Berechnung der Konzentration leitet sich vom Lambert-Beerschen Gesetz ab und erfolgt nach der folgenden Formel. Als Korrekturfaktor für doppelsträngige DNA ist 50 ng/μL, der für einzelsträngige 33 ng/μL.

$$\text{doppelsträngige DNA} \quad c \left[\frac{ng}{\mu L} \right] = A_{260 \text{ nm}} \cdot V \cdot 50 \left[\frac{ng}{\mu L} \right]$$

$$\text{einzelsträngige DNA} \quad c \left[\frac{ng}{\mu L} \right] = A_{260 \text{ nm}} \cdot V \cdot 33 \left[\frac{ng}{\mu L} \right]$$

Formel 3. Berechnung der DNA-Konzentration. c= Konzentration, $A_{260 \text{ nm}}$ = Absorption bei 260 nm, V= Verdünnungsfaktor

RNA-QUANTIFIZIERUNG

Zur Ermittlung der relativen RNA-Konzentrationen bedienen wir uns der quantitativen Realtime-PCR (qPCR), der eine Synthese von cDNA (copy DNA) mittels reverser Transkriptase voraus geht.

REVERSE TRANSKRIPTASE

Alle Schritte werden auf Eis durchgeführt. Zunächst wird ein Master-Mix (4 μL 5X Reaction Buffer, 2 μL 10 mM dNTPs und entweder 1 μL Reverse Transkriptase (Revert aid H minus RT; Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) oder 1 μL ddH_2O , für die minus RT-Kontrolle) hergestellt. In 200 μL Reaktionsgefäßen werden 1 μg RNA und jeweils 0,5 μL einer 10 μM Primer-Verdünnung, für alle zu untersuchenden RNAs, zu 13 μL mit ddH_2O aufgefüllt. Die Reaktionsgefäße werden in einen PCR-Cycler überführt und für 5 Minuten bei 65 °C denaturiert, dann für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dem Ansatz werden 7 μL des Master-Mixs zugegeben und anschließend werden die Proben erneut in den PCR-Cycler überführt und für 60 Minuten bei 42 °C, dann für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert.

QPCR VON MRNAS

Alle Schritte werden auf Eis durchgeführt. Die zuvor hergestellte cDNA wird 1:2,5 mit ddH_2O verdünnt. Für jede zu untersuchende RNA wird ein Master-Mix hergestellt. Der Master-Mix besteht aus 1 μL Primerset (fwd. und rev. jeweils 5 μM), 10 μL Absolute QPCR Capillary Mix 2X, SYBR Green (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) und 5 μL ddH_2O . In einer MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) werden 4 μL der cDNA-Verdünnung vorgelegt und mit 16 μL des Master-Mixs ergänzt. Die 96-well Platte wird im Anschluss mit einer selbstklebenden Folie, MicroAmp™ Clear Adhesive Film (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA), verschlossen und anzentrifugiert. Die so

vorbereiteten Proben werden in einem QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) unter folgenden Bedingungen analysiert.

Tabelle 7: qPCR-Bedingungen

95 °C	15 Minuten	1x
95 °C	10 Sekunden	55x
55 °C	10 Sekunden	
72 °C	10 Sekunden	

Die Auswertung der so erhaltenen Daten erfolgt nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode. (vgl. Livak and Schmittgen, 2001)

QPCR VON MIRNAS

Für die relative Quantifizierung der miRNA Level von miR-33a gegen das Referenzgen U6 wird das Kit „miRCURY™ LNA™ Universal RT microRNA PCR“ in Kombination mit dem „miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit“ (Exiqon, Vedbaek, Denmark) entsprechend den Herstelleranweisungen verwendet. Die Messung erfolgt ebenfalls entsprechend den Herstellerangaben und wird in einem QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) durchgeführt. Die Auswertung erfolgt auch hier nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode. (vgl. Livak and Schmittgen, 2001)

FÜR QPCR VERWENDETE PRIMER

Tabelle 8: verwendete qPCR-Primer

<i>β-Actin fwd.</i>	5'-CCA ACC GCG AGA AGA TGA-3'
<i>β-Actin rev.</i>	5'-CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG-3'
<i>Pim-1 fwd.</i>	5'-ATC AGG GGC CAG GTT TTC T-3'
<i>Pim-1 rev.</i>	5'-GGG CCA AGC ACC ATC TAA T-3'
<i>nsp8 fwd.</i>	5'-CGG TGT TAG GCG CAA GAA TT-3'
<i>nsp8 rev.</i>	5'-AGG AGC ACG GGA GTC AGG TT-3'
<i>SREBP fwd.</i>	5'-GAG CCA GGA AGC CCT CTA TT-3'

<i>SREBP rev.</i>	5'-AAG AAT CCG TGA GCG GTC TA-3'
<i>pri-miR-33a fwd.</i>	5'-TGT GGT GCA TTG TAG TTG CAT-3'
<i>pri-miR-33a rev.</i>	5'-TGT GAT GCA CTG TGG AAA CAT-3'
<i>miR-33a</i>	hsa-miR-33a-5p LNA™ PCR primer set, UniRT (Exiqon, Vedbaek, Denmark)
<i>U6</i>	U6 snRNA (hsa, mmu) PCR primer set, UniRT (Exiqon, Vedbaek, Denmark)

RADIOAKTIVE 5'-ENDMARKIERUNG

Tabelle 9: Radioaktive 5'-Endmarkierung – Reaktionsansatz und Inkubationsbedingungen.

<i>Einfacher Ansatz</i>	
<i>RNA</i>	90 pmol
<i>T4 PNK-Puffer A 10X</i>	1 µL
<i>T4-PNK 10 U/µL</i>	1 µL
<i>γ-³²P-ATP</i>	1 µL
<i>ddH₂O</i>	ad 15 µL
<i>2 Minuten bei 2.000 rpm zentrifugieren;</i> <i>1 Stunde inkubieren bei 37 °C;</i> <i>2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugieren</i>	
<i>Denaturierender Ladepuffer 2X</i>	15 µL

Um die zu untersuchende RNA detektieren zu können, wird diese an ihrem 5'-terminalen Ende radioaktiv markiert. Hierzu wird das 5'-OH der RNA mit Hilfe von γ -³²P-ATP und einer T4 Polynukleotidkinasen (PNK) phosphoryliert. Das verwendete Substrat ist vollständig synthetisch hergestellt worden und verfügt somit über keine bestehende 5'-Phosphorylierung die zunächst entfernt werden müsste.

Die RNA wird zusammen mit den anderen Bestandteilen des Reaktionsansatzes (vgl. Tabelle 9) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Hilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgereinigt. Das gewünschte Fragment wird ausgeschnitten und über Nacht bei 4 °C in Natriumacetat (1 M, pH 5) schüttelnd aus dem Gel eluiert. Das Eluat wird Filtriert, in Ethanol gefällt (500 µL Filtrat, 1 µL Glycogen (20 mg/mL), 1250 µL abs. Ethanol p.a.; gut

vortexen, dann für min. 30 Minuten bei -18 °C inkubieren; zentrifugieren (1 Stunde, 4 °C)) und resuspendiert (Überstand abnehmen; Pellet trocknen (5 Minuten, RT); in 10 µL ddH_2O resuspendieren; anzentrifugieren). Die Aktivität des Ansatzes wird mit Hilfe eines Szintillationszählers (TriCarb, PerkinElmar, USA) bestimmt.

PROBING

Tabelle 10. RNA Rückfaltung - Reaktionsansatz und Inkubationsbedingungen.

<i>Einfacher Ansatz</i>	
<i>^{32}P markierte RNA</i>	10.000 cpm
<i>RNA (nicht markiert)</i>	125 ng
<i>TE-Puffer 2X</i>	0,5 µL
<i>ddH_2O</i>	ad 1 µL
<i>10 Minuten, 65 °C</i> <i>10 Minuten, RT</i>	
<i>MgCl₂ 300 µM</i>	0,1 µL
<i>10 Minuten, RT</i>	

Die Sekundärstruktur der 5' UTR des Virusproteins 35 (VP35) wird mit Hilfe chemischer und enzymatischer Sonden ermittelt. Um die RNA initial in ihre native Sekundärstruktur zurück zu falten, wird diese 10 Minuten auf 65 °C im PCR-Cycler erhitzt und dann 10 Minuten bei Raumtemperatur langsam abgekühlt, ehe 1,2 µL einer 300 mM MgCl₂ Lösung zugegeben werden. Dieser Ansatz wird anschließend für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

ALKALISCHE HYDROLYSE (OH-LEITER)

Tabelle 11. Alkalische Hydrolyse - Reaktionsansatz und Inkubationsbedingungen.

Einfacher Ansatz	
Rückgefaltete RNA (10.000 cpm / μL)	1 μL
Alkalischer Puffer 10X	0,5 μL
ddH ₂ O	3,5 μL
45 Sekunden, 95 °C	
Denaturierender Ladepuffer 2X	5 μL

Um die folgenden Spaltungsprodukte den einzelnen Nukleotiden zuordnen zu können, wird eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Die RNA wird für 45 Sekunden bei 95 °C einer 10 mM Na₂CO₃ / NaHCO₃ ausgesetzt. Abgestoppt wird die Reaktion durch die Zugabe eines denaturierenden Ladepuffers.

BLEISPALTUNG

Tabelle 12: Bleispaltung - Reaktionsansatz und Inkubationsbedingungen.

Einfacher Ansatz	
Rückgefaltete RNA (10.000 cpm / μL)	1 μL
Pb ²⁺ (5 mM)	1 μL
5X TN-Puffer	1 μL
ddH ₂ O	2 μL
10 Minuten, RT	
Denaturierender Ladepuffer 2X	5 μL

In Anwesenheit zweiwertiger Blei-Kationen kommt es zur Spaltung einzelsträngiger RNA-Abschnitte. Die zuvor rückgefaltete und P32-markierte RNA wird für 10 Minuten bei Raumtemperatur, mit einem Bleipuffer versetzt, inkubiert. Abgestoppt wird die Reaktion durch die Zugabe eines denaturierenden Ladepuffers.

RNASE T1 VERDAU

Ein Verdau mit der Endonuklease T1 ermöglicht spezifisch nach Guanin, das in einzelsträngigen Abschnitten der RNA vorliegt, zu schneiden. Daher wird der Verdau einmal unter nativen Bedingungen durchgeführt und einmal unter denaturierenden. Unter letzteren ist entsprechend eine Spaltung nach jedem Guanin zu erwarten. Auch hier wird die Reaktion durch die Zugabe eines denaturierenden Ladepuffers abgestoppt.

Tabelle 13: T1-Verdau - Reaktionsansatz und Inkubationsbedingungen.

	<i>denaturierend</i>	<i>nativ</i>
<i>Rückgefaltete RNA (10.000 cpm / μL)</i>	1 μ L	1 μ L
<i>RNase T1 (1:500 Verdünnung)</i>	1 μ L	0,5 μ L
<i>5X TN-Puffer</i>	1 μ L	1 μ L
<i>8 M Urea-Lösung</i>	2 μ L	-
<i>ddH₂O</i>	-	2,5 μ L
	5 Minuten, 55 °C	30 Sekunden, 37 °C
<i>Denaturierender Ladepuffer 2X</i>	5 μ L	5 μ L

KLONIERUNG

Für die Durchführung des Dual-Luciferase-Assays ist es notwendig die zu untersuchenden 5'-UTRs in den DLA-Vektor pFR_HCV_xb vor die Firefly-Luciferase zu klonieren. Der Vektor enthält neben den beiden Luciferasen auch verschiedene andere Merkmale. Hierzu gehören neben einer Ampicillinresistenz auch der HSV TK Promotor, der die Transkription der Luciferasen steuert. Die praktische Durchführung der Klonierung, vieler der in dieser Arbeit gezeigten Konstrukte, wurden von Wiebke Obermann im Rahmen einer von mir betreuten Masterarbeit durchgeführt. Die Plasmidkarten, verwendeten Primer, sowie einen Sequenzausschnitt der jeweiligen Inserts, sind im Anhang dieser Arbeit beige-fügt.

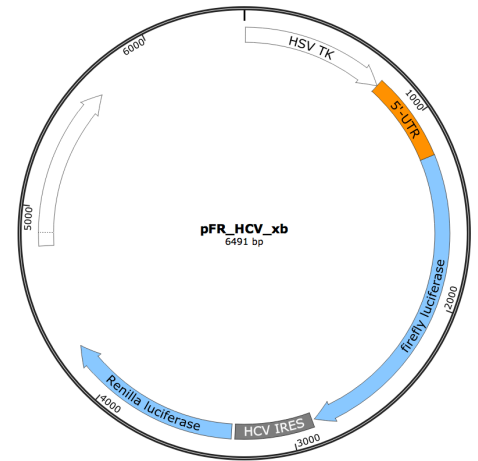


Abbildung 36: Schema einer Plasmidkarte
- pFR_HCV_xb mit einer 5'-UTR

KLONIERUNGSPLANUNG (SNAPGENE)



Abbildung 37: Ausschnitt der Plasmidsequenz. Die Nukleotidsequenz des Plasmids pFR_HCV_xb+Pim-1 im Bereich der Pim-1 5'-UTR.

Die Planung der einzelnen Klonierungen wird mit der Software SnapGene durchgeführt. Diese ermöglicht es, alle für die Klonier-

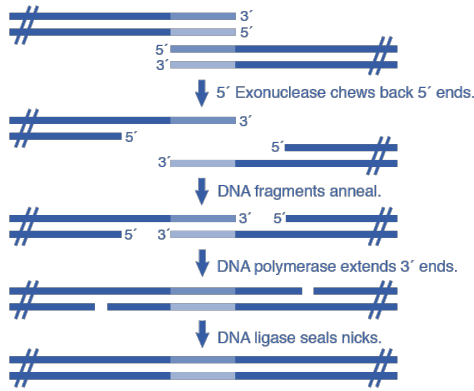


Abbildung 38: Gibson Assembly. Schematische Darstellung der Methode. (Biolabs, 2012)

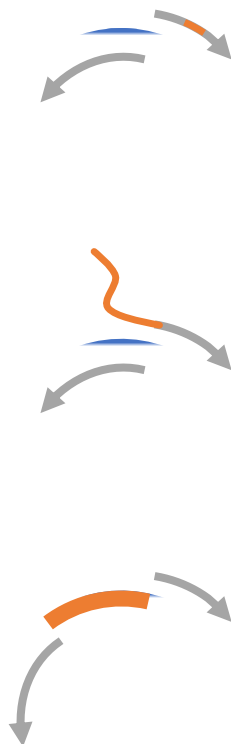


Abbildung 39: Site-directed Mutagenesis. Schematische Darstellung – Oben: Primer mit Punktmutation; Mitte: Primer mit kurzer Insertion; Unter: Primer zur Deletion.

ung notwendigen Primer zu designen und gewährleistet gleichzeitig die Dokumentation der entstehenden Plasmide und deren Herstellungsverfahren.

Die verwendeten Primer sind den jeweiligen zugeordnet, dem Anhang zu entnehmen.

KLONIERUNG MIT GIBSON-ASSEMBLY

Durch die Kombination einer 5' - 3' Exonuklease, einer Polymerase und einer Ligase in einem Ansatz, ist es bei dieser Methode möglich, verschiedene Inserts in einen Vektor unabhängig von Restriktionsschnittstellen zu klonieren (Abbildung 38). Dafür ist es lediglich notwendig, dass die einzelnen Fragmente einen ausreichend langen, komplementären Überhang besitzen. Dieser kann in der Regel im Vorfeld, mittels entsprechend entworfener Primer, durch eine PCR erstellt werden.

Die Klonierungen erfolgen entsprechend dem Herstellerprotokoll mit Hilfe der in SnapGene zuvor designten Primer und dem Gibson Assembly® Cloning Kit (New England Biolabs, Ipswich, USA).

SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

Um gezielt Mutationen in den bereits konstruierten und klonierten Vektoren einfügen zu können, wird die *site-directed Mutagenesis* verwendet. Hierbei werden gezielt konstruierte Primer eingesetzt, die entweder die gewünschte Mutation in sich tragen oder die Primer werden für eine Deletion bestimmter Abschnitte entsprechend positioniert. Die mit diesen Primern entstandenen PCR-Produkte werden nach einem DpnI-Verdau, der verbliebene Template-DNA abbaut, phosphoryliert und anschließend ligiert.

DPNI-VERDAU

Um Templat-DNA aus den PCR-Ansätzen zu entfernen, wird mit Hilfe des Restriktionsenzym DpnI gezielt methylierte DNA abgebaut. Hierzu wird das Enzym FastDigest DpnI (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

PHOSPHORILIERUNG

Um bei der oben beschriebenen Site-directed Mutagenesis das entstandene PCR-Produkt *blunt-end* zu legieren, müssen zunächst die 5'-Enden der DNA-Produkte phosphoryliert werden. Hierzu wird die T4-Polynukleotid-Kinase (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

Tabelle 14: Phosphorylierungsansatz

	1X
PCR-Produkt (aufgereinigt)	10-20 pmol
10X Reaktionspuffer A	2 µL
ATP 10 mM	2 µL
T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/µL)	1 µL
ddH ₂ O	ad 20 µL

Der Reaktionsansatz wird für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 75 °C hitzeinaktiviert.

LIGATION

Tabelle 15: Ligationsansatz

	Blunt-end	Sticky-end
DNA 1:3 (Vektor:Insert)	12 - 120 fmol	60 - 180 fmol
5X Ligase-Reaktions-Puffer	2 µL	
T4-DNA-Ligase 5 U/µL	1 U	5 U
ddH ₂ O	ad 20 µL	

Die phosphorilierten DNA-Fragmente werden mit Hilfe einer Ligase (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA). Die Durchführung entspricht dem Herstellerprotokoll. Der in Tabelle 15 beschriebene Ansatz wird bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert und anschließend in chemisch kompetente Zellen transformiert.

TRANSFORMATION

E.coli DH5 α werden auf Eis aufgetaut und je zu transformierendes Plasmid, 50 μ L E.coli DH5 α , in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. 10 μ L Ligations-Ansatz werden zu den E.coli geben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C. Dann werden die Ansätze erneut für 5 Minuten auf Eis inkubiert und jeweils 1 mL vorgewärmtes LB-Medium werden zugeben. Die so behandelten Bakteriensuspensionen werden anschließend für 1 Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

Zur Selektion werden 100 μ L der Suspension auf einer LB-Agar-Platte (mit 100 μ g/mL Ampicillin) ausgestrichen. Die verbliebene Suspension wird bei 2000 rpm für 1 Minute zentrifugiert, das Pellet in wenig LB-Medium resuspendiert und auf eine zweite Platte ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die entstandenen Kolonien werden auf ein Vorhandensein des gesuchten Plasmids hin untersucht.

KOLONIE-PCR

Tabelle 16: PCR-Schema Kolonie-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
95 °C	15 Minuten	1
95 °C	15 Sekunden	30
57 °C	20 Sekunden	
72 °C	20 Sekunden	
72 °C	1 Minute	1
4 °C	∞	

Mit Hilfe der Kolonie-PCR können kleinste Mengen DNA aus gepickten Bakterienkolonien auf das Vorhandensein gesuchter DNA-Sequenzen hin untersucht werden. Hierzu werden die Kolonien mit einer Pipettenspitze aufgenommen und diese kurz und sachte in in 50 μ L ddH_2O geschwenkt. Anschließend werden die gepickten Kolonien an der Pipettenspitze auf LB-Agar-Platten, welches mit Ampicillin versetzt ist (100 μ g/mL), ausgestrichen.

Die 50 μ L Ansätze werden für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Für einen 20 μ L PCR-Ansatz werden 14 μ L dieser Ansätze jeweils als Templat DNA mit 4 μ L CytoPol Hot Blend Mastermix (10 mM

MgCl₂) (Cytogen GmbH, Wetzlar, Deutschland) eingesetzt. Als Primer dienen jeweils 10 pmol eines Primers, der auf dem Insert bindet, und 10 pmol eines entgegen gerichteter Primers, der komplementär zu dem Vektorbackbone ist. Die PCR-Reaktion läuft nach dem in Tabelle 16 dargestellten Schema ab. Auf diese Weise entstehen nur Amplifikate, wenn der Vektor das gesuchte Insert trägt. Die PCR-Produkte werden mittels *Agarose-Gelelektrophorese* ausgewertet.

KONSERVIERUNG IN GLYCERIN

Um Plasmide langfristig zu lagern, werden von diesen Glycerin-Stocks angelegt. Von der Übernachtskultur der *E. coli* DH5 α , welche mit dem gewünschten Plasmid transformiert sind, werden 500 μ L mit 500 μ L Glycerin gemischt und dann bei -80 °C gelagert.

SEQUENZIERUNG

Zur Sequenzierung werden die zuvor mittels

Säulchenaufreinigung vorbereiteten DNA-Proben in der vom Sequenzierungslabor definierten Konzentration eingestellt und mit dem gewünschten Primer versetzt. Die Proben werden mit dem Prepaid-Lable gekennzeichnet und per Post an das entsprechende Labor gesandt. Nach einem Werktag kann die Sequenz online heruntergeladen und mit Hilfe des Programms SnapGene ausgewertet werden.

PROTEIN-METHODEN

ZELLYSE

Die Zellen werden resuspendiert und in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Zellsuspension wird dann zentrifugiert (2.500 rpm; 5 min) und der Überstand abgenommen und verworfen. Die entstandenen Pellets werden mit 60 µL Lysepuffer (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % SDS, 1,4 M 2-Mercaptoethanol, 0,05 % Bromophenol blau) resuspendiert und gründlich gevortext.

SDS-PAGE

Die im Zelllysate enthaltenen Proteine werden mit Hilfe der SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Untersuchung des Pim-1 Proteins werden 15 % SDS-Polyacrylamid-Gele mit Sammel- und Trenngel verwendet (vgl. Tabelle 17). Die Gele werden zwischen zwei Glasscheiben gegossen, die in eine Halterung gespannt sind und ein Auslaufen der Lösungen vor dem Auspolymerisieren verhindern. Zunächst wird der Raum zwischen den Glasplatten zu etwa 4/5 mit Trenngel aufgefüllt und im noch flüssigen Zustand mit Isopropylalkohol überschichtet. Nach der Polymerisation dieser Schicht, wird das Isopropanol abgenommen und das Sammelgel eingegossen. Vorsichtig wird der Kamm eingesetzt und das Gel kann auspolymerisieren.

Tabelle 17: Zusammensetzung 15 % SDS-PAA Gele – Ansatz für 4 Gele

	Trenngel	Sammelgel
<i>4X Sammelgel-Puffer (0,6 % SDS, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8)</i>	4 mL	-
<i>4X Trenngel-Puffer (0,6 % SDS, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8)</i>	-	1,8 mL
<i>Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) (CarlRoth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)</i>	8 mL	1 mL
<i>APS (10 % Lösung)</i>	80 µL	50 µL
<i>TEMED</i>	20 µL	20 µL
<i>adH₂O</i>	ad 16 mL	ad 7,5 mL

Die Elektrophorese erfolgt in den Gelkammern „Bio-Rad Mini-PROTEAN® 3 cell mini gel system“ (Bio-Rad, München, Deutschland) in Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris-HCl, 0,01 % SDS). Die zu untersuchenden Proben werden zunächst für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend in die mit Laufpuffer gut gespülten Taschen der vorbereiteten Gele geladen. Die Elektrophorese erfolgt in zwei Schritten, zuerst für 10 Minuten bei 180 V, dann für 1 Stunde bei 80 V. Das Bromphenolblau des Lysepuffers, sollte aus dem Gel ausgelaufen sein.

WESTERN-BLOT

Durch den Western-Blot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen. So ist es möglich, einzelne Proteine durch Antikörper spezifisch zu detektieren.

Das SDS-PAA Gel wird in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Glycin, 10 % Methanol) inkubiert, während die Whatman-Papiere und eine entsprechend große PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran (Immobilon®-P PVDF Membrane, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) vorbereitet werden. Die Whatman-Papiere werden mit Transferpuffer getränkt und die Membran 15 Sekunden in Methanol, dann 1-2 Minuten in H₂O geschwenkt, bevor auch diese für 5 Minuten in Transferpuffer inkubiert wird. Anschließend wird ein Sandwich aufgebaut: *Anode* – Whatman-Papier – Membran – Gel – Whatman-Papier – *Kathode*

In der Blotting-Apparatur „Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell“ (Bio-Rad, München, Deutschland) werden die Proteine für 40 Minuten bei 10 V auf die Membran geblottet. Die Membran wird anschließend für 2 Stunden in einer Milchpulver-Lösung (5 % (m/V) Milchpulver in TBST-Puffer) geblockt.

Die Membran wird dann 3-mal für 5 Minuten in TBST-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) gewaschen und über Nacht bei 4 °C in 10 mL Pim-1 mouse Antikörper-Lösung (1:500 in TBST) inkubiert. Die Membran wird wieder 3-mal für 5 Minuten in TBST-Puffer gewaschen, ehe die

Membran für 1 Stunde bei RT in 10 mL antimouse IgG-HRP Antikörper-Lösung (1:5000 in TBST) inkubiert wird.

DETEKTION

Alle Schritte werden in einer Dunkelkammer bei Rotlicht durchgeführt. Zur Detektion mittels Chemilumineszenz werden die mit Antikörpern markierten Proteine mit dem ECL-Reagenz „Western Lightning Plus-ECL“ (PerkinElmer, Waltham, USA) entsprechend den Herstelleranweisungen behandelt. Die so vorbereitete Membran wird auf einen „BioMax™ light films“ Röntgenfilm (Kodak, Rochester, USA) aufgelegt und fotochemisch mit dem Entwickler „GBX Developer“ (Kodak, Rochester, USA) und dem Fixierer „GBX Fixer“ (Kodak, Rochester, USA) entwickelt.

STRIPPEN UND ERNEUTE ANTIKÖRPER MARKIERUNG

Die Membran wird in Stripping-Puffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,7, 100 mM 2-Mercaptoethanol, 2 % SDS) für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert und anschließend 3-mal für 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Dann wird die Membran für 2 Stunden in 5 %iger Milchpulver-Lösung schüttelnd inkubiert und erneut 3-mal für 5 Minuten mit TBST gewaschen. Diesmal wird die Membran in 10 mL einer Mischung von β -Actin mouse Antikörper und antimouse IgG-HRP Antikörper-Lösung (jeweils 1:5000 in TBST) für 40 Minuten inkubiert. Die Detektion erfolgt wieder wie zuvor beschrieben, die Dauer des Auflegens der Membran auf den Film kann deutlich variieren.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION



„Zwei Dinge pflegen den Fortschritt der Medizin aufzuhalten: Autoritäten und Systeme.“

-Rudolph Virchow-

SIMVASTATIN ALS INHIBITOR VON PIM-1

Statine, wie Simvastatin, führen über eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase zu einer Senkung der Cholesterol Biosynthese. In unserer Arbeitshypothese gehen wir davon aus, dass eine Senkung der Cholesterol-Konzentration in der Zelle zu einer vermehrten Expression von SREBP2, als zentraler Transkriptionsfaktor des HMG-CoA-Reduktase Gens, führt. Wie bereits zuvor beschrieben (*MicroRNAs und miR-33a*), wird die miRNA, miR-33a, zusammen mit SREBP2 coexpressiert. Als eines der Ziele von miR-33a sollte das Proto-Onkogen Pim-1 durch die verstärkte miRNA-Expression entsprechend herunter reguliert werden.

STATIN-EFFEKT AUF RNA-KONZENTRATIONEN

Um diese Arbeitshypothese zu untersuchen, wurde die Konzentrationen der beteiligten mRNAs, pri-miRNA und miRNA, von mit Simvastatin behandelten und unbehandelten Krebszellen, mit Hilfe der qRT-PCR (quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) bestimmt und miteinander verglichen. Die unbehandelten Kontrollen wurden an Stelle von in DMSO gelöstem Simvastatin mit der gleichen Menge DMSO ohne Zusatz von Statin behandelt und für zwei Tage inkubiert.

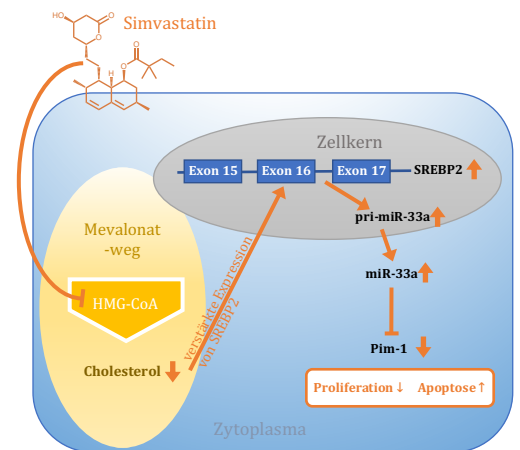


Abbildung 40: Arbeitshypothese der Statinwirkung

WIRKUNG AUF HEPG2 ZELLEN

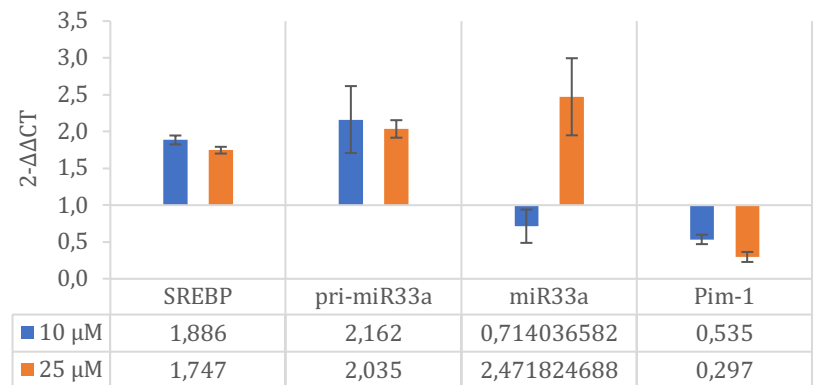


Abbildung 41: qRT-PCR Daten von HepG2 Zellen nach Simvastatin-Behandlung.

Relative Konzentrationen der angegebenen RNAs in isolierter Gesamt-RNA bezogen auf β -Aktin (SREBP, pri-miR33a, Pim-1) bzw. U6 (miR-33a) und entsprechenden DMSO-Kontrollen. Die Zellen wurden zuvor 2 Tage mit Simvastatin und DMSO behandelt. (SREBP 10 μ M: n=3, SD 0,060; 25 μ M: n=3, SD 0,046), (pri-miR33a 10 μ M: n=3, SD 0,455; 25 μ M: n=3, SD 0,068), (miR33a 10 μ M: n=6 SEM 0,226, 25 μ M: n=6, SD 0,523), (Pim-1 10 μ M: n=3 SD 0,064, 25 μ M: n=3 SD 0,068)

Nach der Behandlung der HepG2-Zellen mit Simvastatin kommt es zu einem Anstieg der SREBP mRNA Expression um den Faktor 1,7 und mehr, bezogen auf die unbehandelten Proben. Da miR-33a in einem Intron von *sreb*p codiert ist, kann entsprechend auch eine Zunahme der pri-miR-33a Spiegel um das Doppelte beobachtet werden. Bei einer Statin-Konzentration von 25 μ M ist dieser Effekt in ähnlichem Umfang auch bei den murenen miRNA Spiegeln zu erkennen. Wie die Arbeitshypothese erwarten lässt, resultieren aus der erhöhten miRNA Konzentration Pim-1 mRNA Spiegel, die um mehr als die Hälfte reduziert sind. Da jedoch die Pim-1 Level bereits unter 10 μ M Simvastatin sinken, muss zusätzlich ein alternativer Mechanismus beteiligt sein.

WIRKUNG AUF LS174T

Eine Behandlung von LS174T Zellen mit Simvastatin in gleichen Konzentrationen zeigt keinen Effekt auf die mRNA Spiegel von SREBP. Es zeigen sich auch keine Effekte auf die Konzentrationen von pri-miR-33a oder die prozessierte mature miR-33a, wie dies auch aus dem zuvor beschriebenen Modell zu erwarten ist.

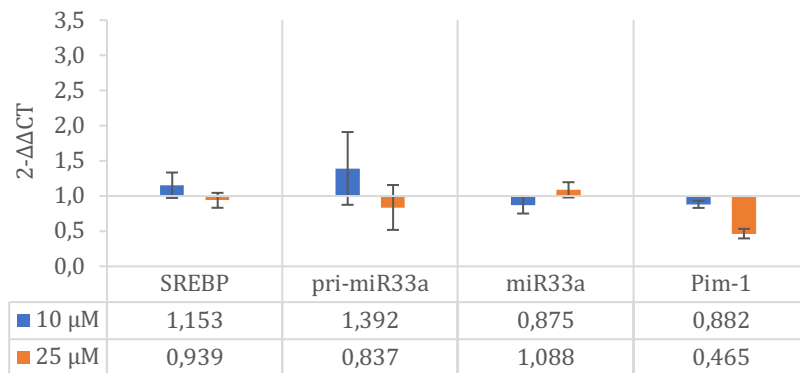


Abbildung 42: qRT-PCR Daten von LS174T Zellen nach Simvastatin-Behandlung.

Relative Konzentrationen der angegebenen RNAs in isolierter Gesamt-RNA bezogen auf β -Aktin (SREBP, pri-miR33a, Pim-1) bzw. U6 (miR-33a) und entsprechenden DMSO-Kontrollen. Die Zellen wurden zuvor 2 Tage mit Simvastatin und DMSO behandelt. (SREBP 10 μ M: n=3, SD 0,181; 25 μ M: n=3, SD 0,106), (pri-miR33a 10 μ M: n=3, SD 0,517; 25 μ M: n=3, SD 0,319), (miR33a 10 μ M: n=3 SD 0,123, 25 μ M: n=3, SD 0,109), (Pim-1 10 μ M: n=3 SD 0,050, 25 μ M: n=3 SD 0,068)

Die Pim-1 mRNAs zeigen erst bei einer Konzentration von 25 μ M Simvastatin eine deutliche Reduktion auf etwa 50 % der unbehandelten Proben. Es liegt also nahe, dass die Reduktion auf einen miR-33a unabhängigen Mechanismus zurückgeführt werden muss.

WIRKUNG AUF SKOV3 ZELLEN

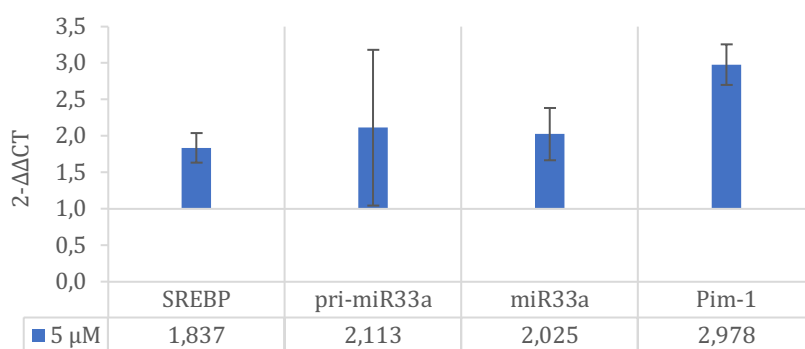


Abbildung 43: qRT-PCR Daten von Skov3 Zellen nach Simvastatin-Behandlung.

Relative Konzentrationen der angegebenen RNAs in isolierter Gesamt-RNA bezogen auf β -Aktin (SREBP, pri-miR33a, Pim-1) bzw. U6 (miR-33a) und entsprechenden DMSO-Kontrollen. Die Zellen wurden zuvor 2 Tage mit Simvastatin und DMSO behandelt. (SREBP: n=3, SD 0,203), (pri-miR33a: n=3, SD 1,069), (miR33a: n=3 SD 0,359), (Pim-1: n=3 SD 0,278)

Die Zelllinie Skov3 exprimiert endogen kein Pim-1 auf Protein-Ebene. Eine Behandlung mit Simvastatin zeigt hier einen indukti-

ven Effekt auf die untersuchten RNA-Spiegel. Es kommt zwar wie erwartet zu einem Anstieg der SREBP-mRNA Expression und damit auch der pri-miR-33a und miR-33a Level, doch zeigen die behandelten Zellen eine etwa 3-fach höhere Pim-1 mRNA Konzentration als die Zellen der DMSO-Kontrollen. Diese Reaktion auf die Behandlung legt nahe, dass die Wirkung von Simvastatin, in hohem Maße abhängig vom Zelltyp ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nur in HepG2 Zellen der von uns postulierte Wirkmechanismus von Simvastatin und auch nur bei einer Konzentration von 25 μ M für die Senkung der Pim-1 Level mit den vorliegenden qRT-PCR Daten erklärt werden kann; dieser Mechanismus aber nicht auf alle Zelltypen übertragbar ist. In LS174T Zellen kommt es zwar nach Behandlung mit einer höheren Statin-Konzentration zu einer Reduktion der Pim-1 Level, die anderen untersuchten, unveränderten RNA-Spiegel, deuten hier jedoch auf einen alternativen Wirkmechanismus hin. Es muss aber an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass gerade die HepG2 Zellen hierbei von besonderer Relevanz sind, da bei diesen, als entartete Leberzellen, die anabolen Stoffwechselwege besonders aktiv sind.

SIMVASTATIN INDUZIERTE APOPTOSE

Zur Bestimmung der Apoptose-Aktivität wurden die Zellen sowohl mit Simvastatin als auch mit entsprechender DMSO Kontrolle behandelt und einem Caspase-Assay unterzogen. Dieser misst die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7, deren Aktivierung als Bestandteile der apoptotischen Enzymkaskade mit der Apoptose-Aktivität korreliert.

Unter Simvastatin-Behandlung kann ein dosisabhängiger Anstieg der Apoptose sowohl in HepG2 als auch in LS174T Zellen beobachtet werden. Bei der höheren Konzentration steigt die Caspase-Aktivität etwa auf das 1,5-fache der DMSO-Kontrolle an. Es ist auffällig, dass sich bei den LS174T Zellen unter der niedrigen Simvastatin-Konzentration kein Effekt auf die Caspase-Aktivität zeigt; ganz ähnlich der Wirkung auf die Pim-1 mRNA-Spiegel, die

sich auch erst bei der höheren Konzentration von 25 μM Simvastatin einstellt.

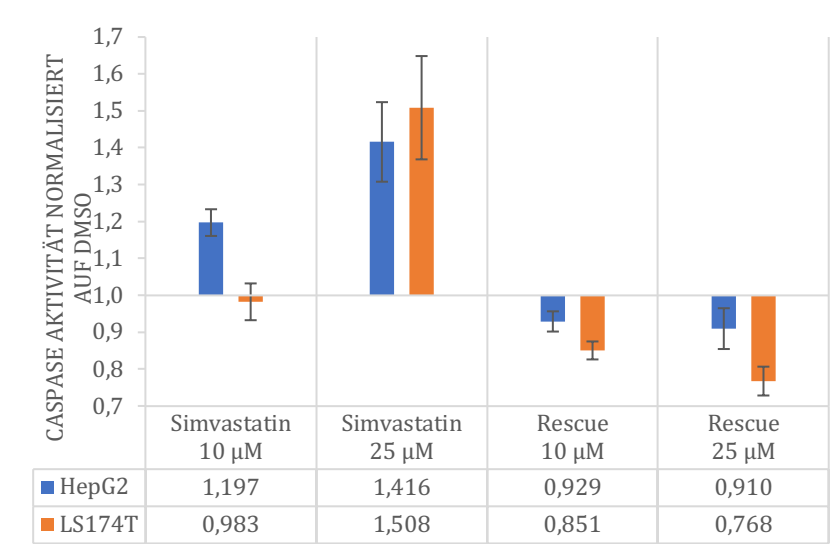


Abbildung 44: Caspase-Assay – Mevalonat-Rescue unter Simvastatin-Behandlung in HepG2- und LS174T-Zellen Mittelwert mit SEM der Caspase-Aktivität (n=8); nach 2 Tagen Inkubation unter Behandlung mit Simvastatin in den Konzentrationen 10 μM und 25 μM mit und ohne Sublimierung von Mevalonat (Rescue) normalisiert auf entsprechende DMSO-Kontrollen. (SEM HepG2: S10 μM 0,036, S25 μM 0,108, R10 μM 0,027, R25 μM 0,055; LS174T: S10 μM 0,050, S25 μM 0,140, R10 μM 0,024, R25 μM 0,039)

Unter Substitution von Mevalonat, dem Produkt der HMG-CoA-Reduktase, die von Statinen inhibiert wird, sinkt die Caspase-Aktivität auf Werte unterhalb der DMSO-Kontrollen. Da die Wirkung durch das Substituieren von Mevalonat wieder aufgehoben werden kann, liegt eine Verbindung zum Cholesterin-Stoffwechsel und damit zum Mevalonatweg nahe. Dies unterstützt den von uns beschriebenen Wirkmechanismus.

Die Wirkung auf die Proliferation von Simvastatin wird bei der Durchführung eines WST-1 Assays deutlich. Hierzu wurden LS174T Zellen mit steigenden Konzentrationen Simvastatin bzw. DMSO behandelt und nach 48 Stunden Inkubation die Menge lebender Zellen ermittelt.

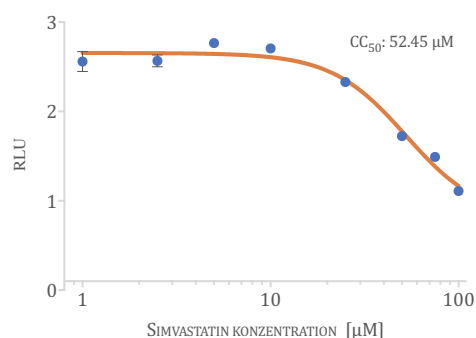


Abbildung 45: Zellproliferation von LS174T-Zellen unter Simvastatin Behandlung. WST-1 Assay nach Behandlung mit angegebener Konzentration Simvastatin (n=8). Auswertung durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Software Prism7.

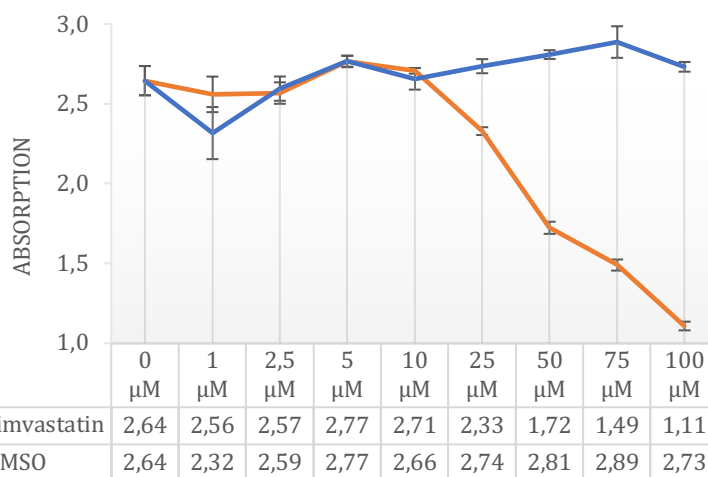


Abbildung 46: WST-1 Assay – Simvastatin-Behandlung in LS174T-Zellen. Bestimmung der Menge an Zellen mit intakter Atmungskette nach 2 Tagen unter Simvastatin-Behandlung bzw. DMSO-Behandlung. (n=8, SEM für Simvastatin-Daten in steigender Konzentration: 0,092; 0,111; 0,067; 0,036; 0,018; 0,024; 0,038; 0,035; 0,027 und SEM für DMSO-Daten in steigender Konzentration: 0,092; 0,163; 0,076; 0,034; 0,067; 0,044; 0,027; 0,099; 0,030)

Bei Konzentrationen oberhalb von 25 µM Simvastatin zeigen sich in LS174T Zellen antiproliferative Effekte (CC₅₀-Wert: 52,45 µM). Dies entspricht der Konzentration, bei der die Pim-1 mRNA Spiegel gesenkt werden und bei der auch eine Caspase-Aktivität festgestellt werden kann.

SILVESTROL IM ONKOGENEN KONTEXT

Da sich die Statine, insbesondere Simvastatin, als wenig vorher-sagbar in ihrer Wirkung auf die Expression des Onkogens Pim-1 erwiesen haben, suchten wir nach alternativen Inhibitoren und wurden aufmerksam auf den selektiven eIF4A Inhibitor Silvestrol (vgl. [Abbildung 47](#)). In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass es sich bei diesem Rocaglamid-Derivat um einen potenten Wirkstoff gegen Pim-1 handelt. (Schatz et al., 2011)

Als Inhibitor des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 4A (eIF4A) ist der Schlüssel für die Selektivität von Silvestrol in der besonderen Beschaffenheit der jeweiligen 5'-untranslatierten Regionen (5'-UTRs) der mRNAs zu finden. Zwar wurde bereits die Wirkung auf Krebszellen in anderen Arbeiten beschrieben (vgl. [Silvestrol](#)), doch von besonderem Interesse ist die Ähnlichkeit der 5'-UTRs von onkogenen mRNAs, mit der komplexen Sekundärstruktur viraler mRNAs. Um diese Beobachtung näher untersuchen zu können, wurde ein Dual-Luciferase-Assay (DLA) etabliert, der eine relative Messung der Translationseffizienz definierter 5'-UTRs ermöglicht.

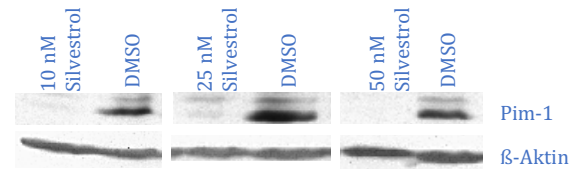


Abbildung 47: Silvestrol-Wirkung auf Pim-1 Pim-1 wird auf Proteinebene in HepG2 Zellen durch Silvestrol dosisabhängig in seiner Expression stark gehemmt.

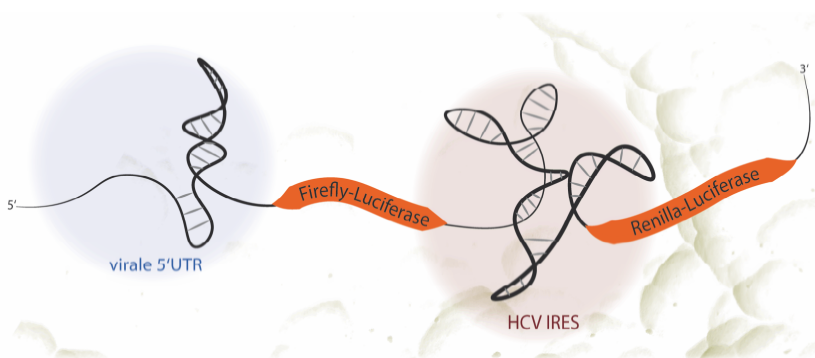


Abbildung 48: Dual-Luciferase-Assay – Schematischer Aufbau

Hierzu wird ein Plasmid in eine humane Krebszelllinie, HepG2, tranfiziert, welches zwei Luciferasen codiert. Bei der ersten handelt es sich um eine Firefly-Luciferase, der die jeweils zu untersuchen- den 5'-UTRs vorangestellt werden und somit ihre Translations- initiation steuern. Die zweite ist eine Renilla-Luciferase und dient

als interne Kontrolle; hierzu wird diese nicht Cap-abhängig translatiert, sondern die Initiation erfolgt über eine HCV IRES, die eIF4A- und damit auch Silvestrol-unabhängig ist.

Mit Hilfe dieses Assays konnten viele Daten bezüglich der Wirkung von Silvestrol erhoben werden. Außerdem sind von Wiebke Obermann, im Rahmen einer von mir betreuten Masterarbeit, verschiedene 5'-UTRs in diesem DLA getestet worden. Diese sind in der Abbildungsbeschreibung zusätzlich gekennzeichnet.

SILVESTROL SENKT PIM-1 TRANSLATION

Um zu prüfen, ob sich die bekannte hemmende Wirkung von Silvestrol auf PIM-1 (vgl. Abbildung 47) in dem beschriebenen DLA nachweisen lässt, wurden Plasmide mit den 5'-UTRs der Haushaltsgene β -Globin und β -Actin sowie mit der 5'-UTR von Pim-1 konstruiert.

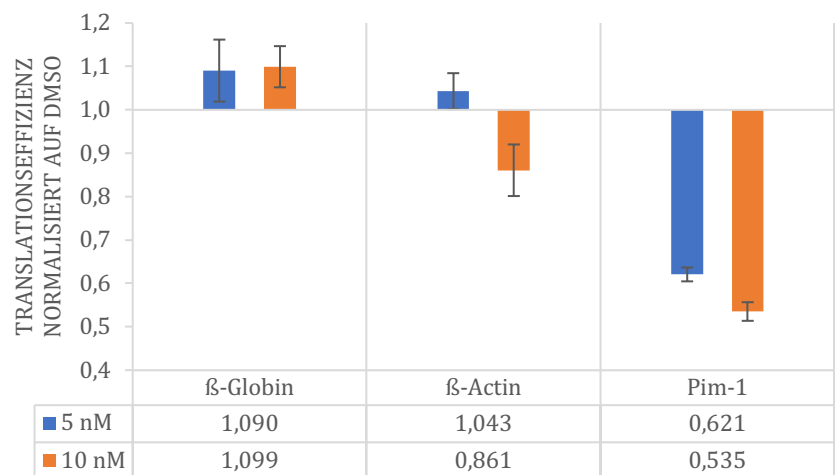


Abbildung 49: Silvestrol Wirkung auf Pim-1 und Haushaltsgene im DLA. Median mit SEM der Translationseffizienz von β -Globin (n = 12), β -Actin (n = 4) und Pim-1 (n = 8); nach 2 Tagen Inkubation bei Behandlung mit 5 nM und 10 nM Silvestrol in HepG2 Zellen. [erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Wiebke Obermann]

Der DLA zeigt bei dem Pim-1 5'-UTR Konstrukt nach Behandlung mit Silvestrol eine deutliche Reduktion der Translationseffizienz um etwa 40 bis 50 % verglichen mit der DMSO behandelten Kontrolle. Die Haushaltsgene β -Globin und β -Actin hingegen zeigen auch bei Behandlung mit Silvestrol eine weitgehend stabile Translation. Dies entspricht der erwarteten Wirkung.

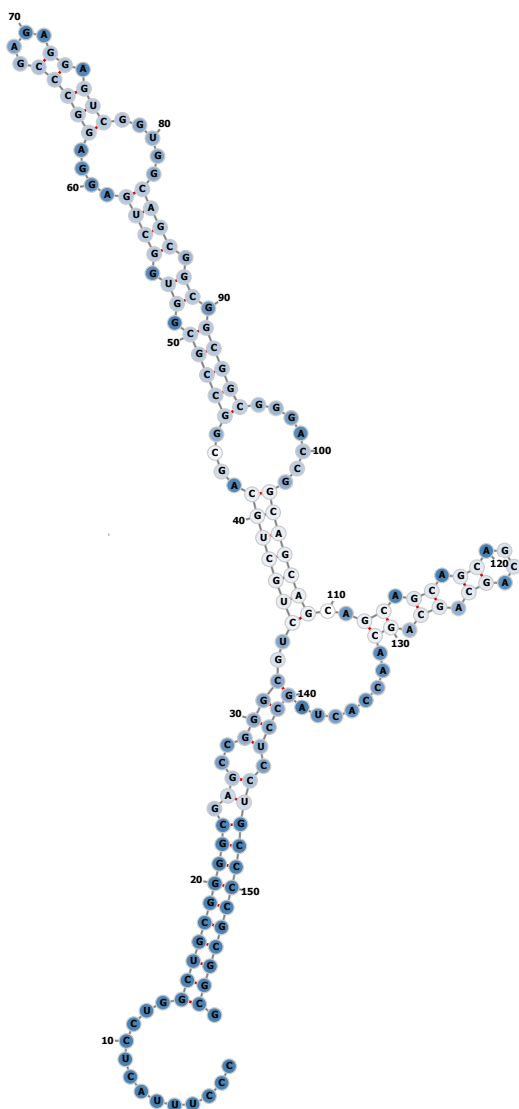


Abbildung 50: Vorhersage der Sekundärstruktur für die Pim-1 5'-UTR. MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)

MÖGLICHER G-QUADRUPLPLEX IN PIM-1 5'-UTR

Die Sekundärstruktur und der GC-Anteil einer 5'-UTR gelten als wichtige Faktoren für ihre Abhängigkeit von der Helikaseaktivität des Faktors eIF4A und damit für ihre Empfindlichkeit auf eine Behandlung mit dem Inhibitor Silvestrol. Wie bereits erwähnt, gelten RNA G-Quadruplexe als eine extrem stabile Form der Sekundärstruktur (vgl. *RNA G-Quadruplex (RG4)*). Ein besonders gut untersuchter ist der Zic-1 G-Quadruplex. Zunächst wurde die Translationseffizienz sowohl dieses GQs als auch die eines mutierten GQs mit der Translationseffizienz des Leervektors verglichen.

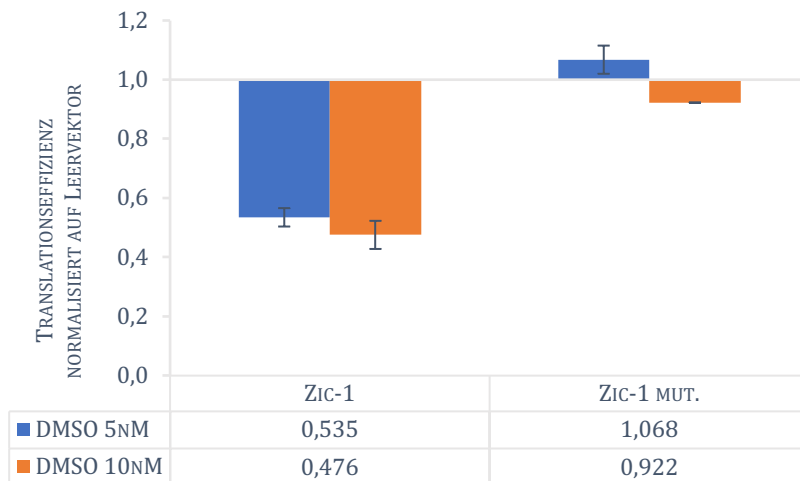


Abbildung 52: Translationseffizienz von Zic-1 und Zic-1 mutiert. Mittelwert mit SEM der Translationseffizienz von Zic-1 und Zic-1 mutierter GQ normalisiert auf Vektor ohne 5'-UTR (n=4); nach 2 Tagen Inkubation in HepG2 Zellen.

Im Vergleich zum Leervektor zeigt der unveränderte Zic-1 GQ die erwartete, starke Reduktion der Translationseffizienz auf etwa 50 % der Effizienz des Leervektors. Wird der Quadruplex durch gezielten Austausch von Guaninen gegen Adenine destabilisiert, so geht dieser Effekt in weiten Teilen verloren (vergleiche Abbildung 51 und Abbildung 52). Er weist eine vergleichbare Translationseffizienz wie der Leervektor auf.

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung von Silvestrol auf diese Konstrukte untersucht und diese mit DMSO behandelten Kontrollen verglichen. Hierzu wurde die Translationseffizienz unter Behandlung mit Silvestrol, mit der Effizienz der DMSO behandelten Kontrolle verglichen. Es werden also jeweils die gleichen Konstrukte

A

Zic-1 GQ



Zic-1 GQ mutiert



B

Zic-1 GQ



Zic-1 GQ mutiert



Abbildung 51: Zic-1 GQs im DLA. A: Im Luciferase-Assay werden die unveränderte und die mutierten G-Quadruplexe der 5'-UTRs von Zic-1 vor die Renilla-Luciferase kloniert. B: Bei der mutierten 5'-UTR ersetzen Thymin-Basen gezielt Guanin-Basen, um die G-Quadruplex-Struktur zu zerstören.

te, bei unterschiedlicher Behandlung, betrachtet. Dabei zeigt sich, dass unter Silvestrol eine Reduktion der Translationseffizienz des Zic-1 Konstrukts mit intaktem G-Quadruplex zu beobachten ist (vgl. Abbildung 53). Eine gezielte Hemmung der Helikase eIF4A resultiert in einer deutlichen Senkung der Translation auf unter 20 % der Kontrolle. Es lässt sich aber gleichzeitig erkennen, dass dieser Effekt, in gleichem Maße, bei der mutierten 5'-UTR auftritt, in der der G-Quadruplex sich nicht mehr formieren kann.

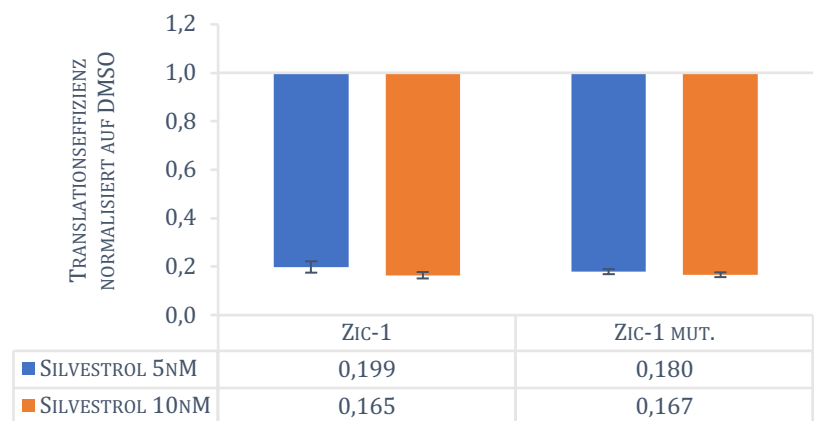


Abbildung 53: Silvestrolwirkung auf GQs. Mittelwert mit SEM der Translationseffizienz von Zic-1 und Zic-1 mutierter GQ unter Behandlung mit 10 nM, 25 nM und 50 nM Silvestrol, normalisiert auf die jeweiligen mit DMSO behandelten Konstrukte (n=4); nach 2 Tagen Inkubation in HepG2 Zellen.

Dieses Experiment wurde als eines der ersten zur Untersuchung der Auswirkung von Silvestrol auf die Translationseffizienz durchgeführt. Als einziges in dieser Arbeit gezeigtes Experiment, wurde hier der psiCheck-Vektor verwendet, dessen zweite Luciferase nicht IRES kontrolliert translatiert wird. Daher wurden die Daten nicht gegen die zweite Luciferase des Vektors als interne Kontrolle normalisiert.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass ein G-Quadruplex einen massiven Einfluss auf die Translationseffizienz hat, die Wirksamkeit von Silvestrol jedoch nicht abhängig von einer solchen Struktur ist. Es gilt aber zu bedenken, dass an der Entwindung einer solchen Struktur auch andere Enzyme beteiligt sein können. Zwar wurde hier nur Zic-1 untersucht, doch scheint ein vermuteter G-Quadruplex als ursächliche Struktur für die Wirksamkeit von Silvestrol auf PIM-1 unwahrscheinlich zu sein.

STRESS INDUZIERTER RESISTENZ VON PIM-1 GEGEN SILVESTROL

Durch Tunicamycin ist es möglich, ER-Stress in Zellen zu induzieren und so Bedingungen zu schaffen, um mögliche alternative Stoffwechselwege zu aktivieren. Kommt es bei der Behandlung von HepG2 Zellen mit Silvestrol unter normalen Bedingungen noch zu einer fast vollständigen Reduktion der Pim-1 Expression, so wird dieser Effekt unter Stressbedingungen aufgehoben (Abbildung 54). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es durch den Stress zu einer Aktivierung einer IRES-Struktur innerhalb der Pim-1 5'-UTR kommt, die zu einer Cap-unabhängigen Translationsinitiation der Pim-1 mRNA führt. Dass Pim-1 eine IRES Struktur aufweist, wurde bereits beschrieben, jedoch konnte eine Induktion durch ER-induzierten Stress von Fernandez et al. bereits widerlegt werden. (Fernandez et al., 2002) Diesem Effekt scheint also ein anderer Mechanismus zugrunde zu liegen.

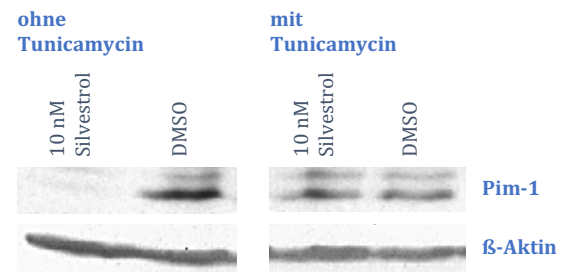


Abbildung 54: Silvestrolwirkung unter Stressbedingungen. Tunicamycin induzierter Stress zeigt eine Art Resistenzwirkung gegen Silvestrol. HepG2 Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit Silvestrol und Tunicamycin.

SILVESTROL IM VIRALEN KONTEXT

Neben Onkogenen wie Pim-1 verfügen auch virale 5'-UTRs über ausgesprochen komplexe Sekundärstrukturen (vgl. Abbildung 57), was unsere Untersuchungen in den viralen Bereich führt.

SILVESTROL HEMMT HIV

Die 5'-UTR des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) wurde in den DLA-Vektor kloniert. Die 5'-UTR ist sehr lang und stark strukturiert, was eine starke Abhängigkeit von der Helikaseaktivität des Initiationsfaktors eIF4A erwarten lässt. Tatsächlich zeigt sich unter der Silvestrol-Behandlung ein dosisabhängiger Effekt bereits ab 5 nM auf die Translationseffizienz. Diese kann schon bei der niedrigsten Konzentration auf unter 60 % reduziert werden, bezogen auf die mitgeführten DMSO-Kontrollen (Abbildung 56).

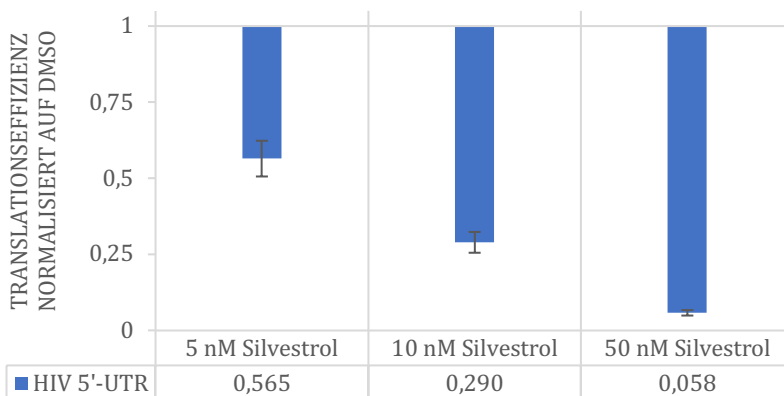


Abbildung 56: Silvestrolwirkung auf HIV 5'-UTR. DLA in HepG2 nach 48 Stunden Inkubation und Behandlung mit 5 nM und 10 nM Silvestrol, normalisiert auf DMSO-Kontrollen. (SEM; n = 8)

Die höchste getestete Dosis liegt mit 50 nM bereits in einem toxischen Bereich für HepG2 Zellen. Zwar sind die Werte durch die interne Kontrolle über die Renilla-Luziferase normalisiert, dennoch sollten die 95 % Reduktion des HIV-Konstrukts zurückhaltend bewertet werden. Bei 10 nM Silvestrol sinkt die Translationseffizienz aber bereits um mehr als 70 % und diese Konzentration liegt deutlich unterhalb der toxischen Konzentration in HepG2 Zellen. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte sich auch auf infizierte Zellen übertragen lassen, erfolgten

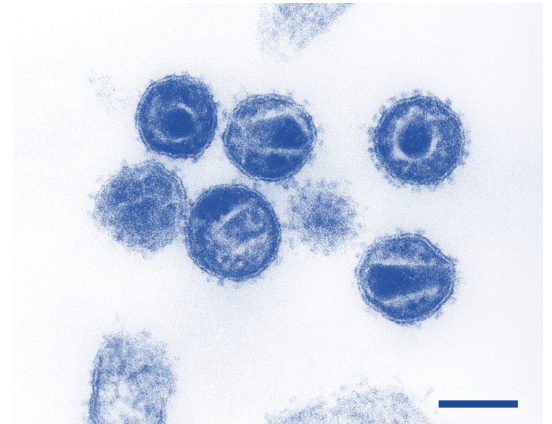


Abbildung 55: HI-Virus. Colorierte elektronenmikroskopische Aufnahme. (Gelderblom, 2014)

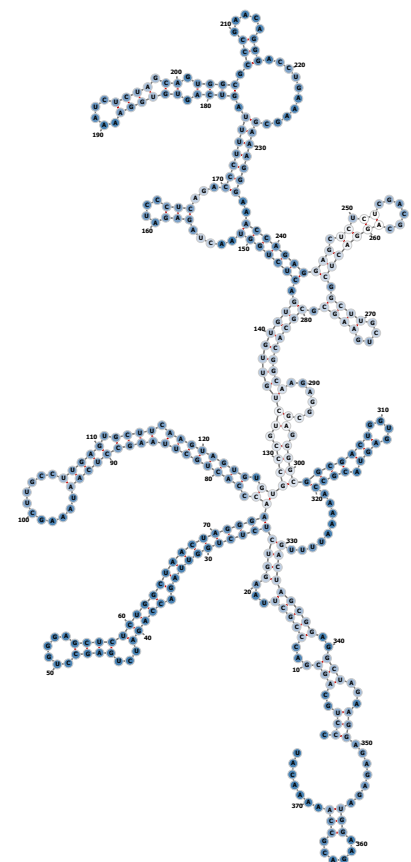


Abbildung 57: Vorhersage der Sekundärstruktur für die HIV 5'-UTR. MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)

Experimente in einer Kooperation mit dem Labor von Prof. Berkhout (Amsterdam). Sein Labor testete in T-Zelllinien, die mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert wurden, den Einfluss von Silvestrol auf die Virusreplikation.

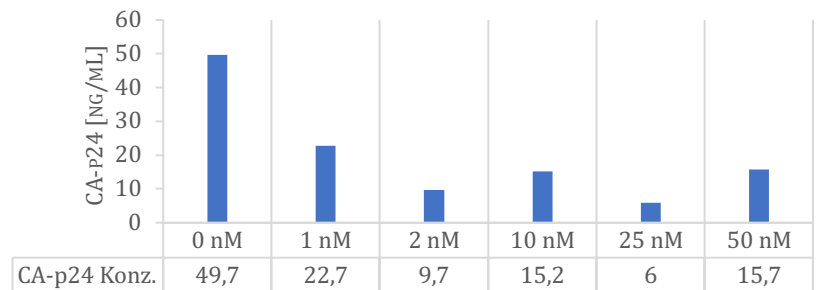


Abbildung 58: CA-p24 Spiegel bei Behandlung mit Silvestrol. T-Zelllinie SupT1 infiziert mit X4 Virus LAI Zellen präinkubiert mit Silvestrol. Virus verbleibt im Ansatz. (n=1) [Experiment durchgeführt im Rahmen einer Kooperation vom Labor Prof. Berkhout, Amsterdam]

Hierzu wurden in einem ersten Experiment die Zellen mit Silvestrol präinkubiert und anschließend mit dem Virus infiziert. Anschließend wird die Konzentration des viralen Kapsidproteins p24 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Man kann eine deutliche Reduktion der Proteinkonzentration um über 50 %, verglichen zur unbehandelten Kontrolle, bereits bei geringen Silvestrol Konzentrationen erkennen (Abbildung 58).

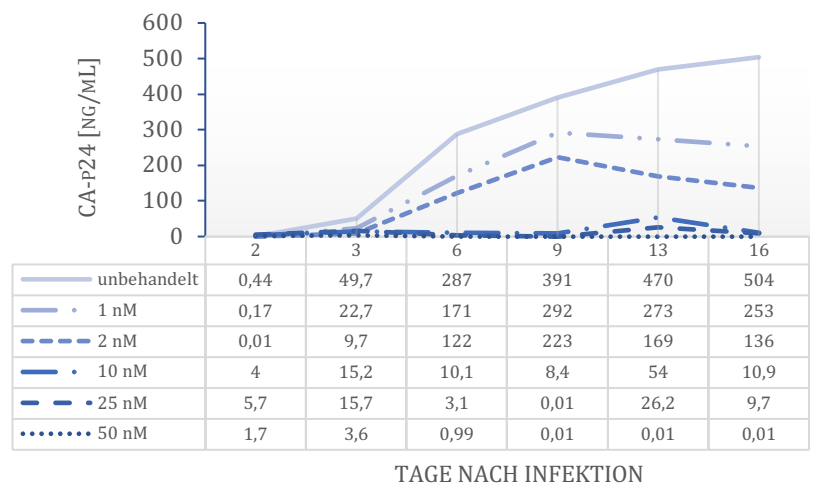


Abbildung 59: CA-p24 Spiegel unter Behandlung mit Silvestrol. T-Zelllinie SupT1 infiziert mit X4 Virus LAI Zellen präinkubiert mit Silvestrol. Virus wird nach 4 h abgenommen. Es werden die Proteinkonzentration gemessen an den angegebenen Tagen (2-16) nach der Infektion in ng/mL dargestellt. (n=1) [Experiment durchgeführt im Rahmen einer Kooperation vom Labor Prof. Berkhout, Amsterdam]

In einem zweiten, ähnlich angelegten Experiment wurden die Virusüberstände, die für die Infektion der Zellen benutzt wurden, nach 4 Stunden abgenommen und durch frisches, mit entsprechenden Silvestrol Konzentrationen sublimentiertem Medium, ersetzt (Abbildung 59). Die Bestimmung der CA-p24 Konzentrationen erfolgte hier zu mehreren Zeitpunkten nach der Infektion. In diesem Experiment wird deutlich, dass die Wirkung von Silvestrol auf die Virusreplikation dosisabhängig zunimmt und über mehrere Tage anhält. Nach 9 Tagen liegt die CA-p24 Konzentration bei der geringsten getesteten Silvestrol Konzentration von 1 nM bereits etwa 25 % unterhalb der unbehandelten Probe. Bei 2 nM liegt diese bei etwas mehr als 50 % und höhere Konzentrationen zeigen am Tag 9 nach der Infektion der Zellen kaum mehr nachweisbare Mengen von CA-p24 im Überstand.

SILVESTROL: WIRKUNG AUF DIE EBOLA VIRUS 5'-UTR

Eine weitere Zielstruktur für die Hemmung von eIF4A als antivirale Strategie ist das Ebola Virus. Sein Genom kodiert sieben Proteine, die alle über eine eigene 5'-UTR verfügen und cap-abhängig translatiert werden.

SILVESTROL HEMMT EBOV 5'-UTR TRANSLATION

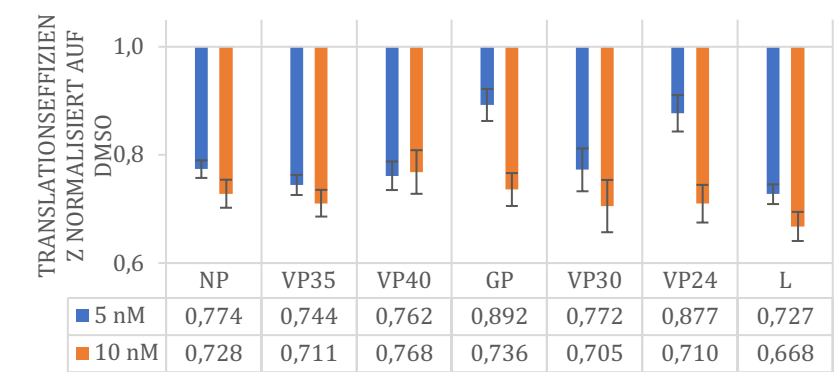


Abbildung 61: Silvestrolwirkung auf EBOV 5'-UTRs. DLA in HepG2 nach 48 Stunden Inkubation und Behandlung mit 5 nM und 10 nM Silvestrol, normalisiert auf DMSO-Kontrollen. (SEM; n = 8 bis 20) [erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Wiebke Obermann]

Wie die beiden bereits beschriebenen 5'-UTRs von Pim-1 und HIV, die sich als empfindlich gegenüber Silvestrol gezeigt haben, weisen



Abbildung 60: Ebolavirus. Colorierte elektronenmikroskopische Aufnahme. (Frederick A. Murphy (CDC), n.d.)

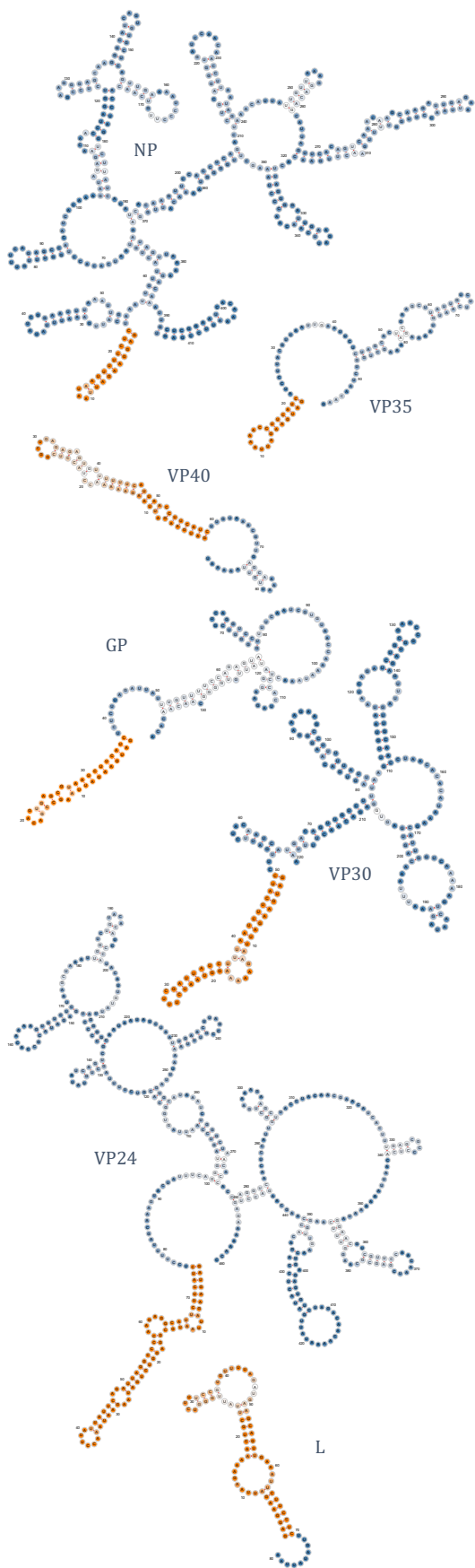


Abbildung 62: Vorhersagen der Sekundärstrukturen aller EBOV 5'-UTRs. Orange hervorgehoben sind die 5'-terminalen Hairpin-Strukturen. MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)

auch die Sekundärstrukturen der 5'-UTRs des Ebola Virus Genoms einen hohen Grad an Komplexität auf (Abbildung 62).

Die Ergebnisse aus den DLAs zeigen, dass alle 5'-UTRs des Ebola Genoms bei einer Silvestrol-Konzentration von 10 nM eine um etwa 30 % reduzierte Translationseffizienz aufweisen. Lediglich bei einer niedrigeren Konzentration von 5 nM zeigt sich, bei den Konstrukten mit der GP und der VP24 5'-UTR, ein geringerer Effekt auf die Translationseffizienz als bei den anderen getesteten EBOV 5'-UTRs. Diese erreichen nur eine um etwa 10 % reduzierte Translationseffizienz. Betrachtet man die untersuchten 5'-UTRs genauer, und vergleicht die Unterschiede mit den Ergebnissen aus den DLAs, so fällt auf, dass die GP und VP24 5'-UTRs einen höheren GC-Gehalt aufweisen als die anderen 5'-UTRs des EBOV Genoms (vgl. Tabelle 18).

EIGENSCHAFTEN DER 5'-UTR UND IHR EINFLUSS AUF IHRE EIF4A ABHÄNGIGKEIT

Tabelle 18; EBOV 5'-UTR Eigenschaften. Länge, GC-Gehalt, minimale freie Energie (MFE) der Hairpins und die maximale Länge durchgehend doppelsträngiger Basen. MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)

	NP	VP35	VP40	GP	VP30	VP24	L
<i>Länge</i>	414 bp	97 bp	89 bp	37 bp	221 bp	460 bp	80 bp
<i>GC-Gehalt</i>	38 %	35 %	33 %	41 %	33 %	40 %	34 %
<i>MFE [kcal/mol]</i>	-100.4	-15.90	-15.50	-30.10	-54.80	-108.8	-21.90
<i>max. Länge ds-Bereiche</i>	10 bp	7 bp	7 bp	11 bp	12 bp	9 bp	8 bp

Alle EBOV 5'-UTRs besitzen eine Hairpin-Struktur im 5'-terminalen Bereich (vgl. Abbildung 62, orangene Bereiche und Abbildung 63), die sich teilweise stark in Länge und GC-Gehalt voneinander unterscheiden (Tabelle 19).

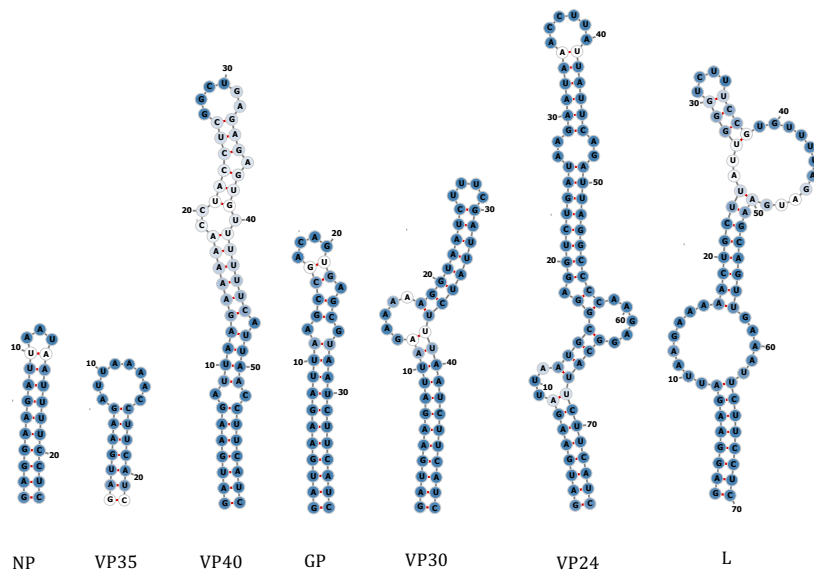


Abbildung 63: Vorhersagen der Sekundärstrukturen der 5' terminalen Hairpins der EBOV 5'-UTRs. MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)

Zwar besitzt die Hairpin-Struktur von VP24 mit -108,8 kcal/mol (gesamte 5'-UTR) und -27,9 kcal/mol (Hairpin) eine geringere Minimale Frei Energie (MFE) als GP mit -30,1 kcal/mol (gesamte 5'-UTR) und -14,5 kcal/mol (Hairpin); dafür weist der GP-Hairpin, mit 11 ununterbrochenen doppelsträngigen Basenpaaren und einem GC-Gehalt von 43 %, eine stärkere Partialstruktur in seinem Hairpin auf als VP24, mit einer maximalen ununterbrochenen doppelsträngigen Sequenz von 9 bp, bei einem GC Gehalt von 39 %.

Tabelle 19: EBOV Hairpin Eigenschaften. Länge, GC-Gehalt, minimale freie Energie (MFE) der Hairpins und die maximale Länge durchgehend doppelsträngiger Basen. MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)

	NP	VP35	VP40	GP	VP30	VP24	L
<i>Länge</i>	23 bp	22 bp	59 bp	37 bp	49 bp	75 bp	70 bp
<i>GC-Gehalt</i>	30 %	32 %	37 %	43 %	27 %	39 %	37 %
<i>MFE [kcal/mol]</i>	-9.10	-7.00	-17.60	-14.50	-19.10	-27.90	-20.70
<i>max. Länge ds-Bereiche</i>	10 bp	7 bp	7 bp	11 bp	12 bp	9 bp	8 bp



Abbildung 64: Vorhersagen der Sekundärstrukturen der GP, GP + VP24 HP, VP24 und VP24 + GP HP 5'-UTRs. Orange hervorgehoben sind die jeweiligen Hairpin-Strukturen. MEF: GP + VP24 HP (-43,5 kcal/mol), VP24 + GP HP (-95,4 kcal/mol). MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)

Die reine Länge der gesamten 5'-UTR kann also als Maßstab für eine eIF4A-Abhängigkeit nicht herangezogen werden. Wichtiger scheinen hier die Hairpin-Strukturen zu sein, die es genauer zu untersuchen gilt. Denn weder die MFE allein, noch die Anzahl infolge gepaarter Basen, scheinen die Empfindlichkeit der 5'-UTRs zu definieren.

VERSTÄRKUNG DER EIF4A-ABHÄNGIGKEIT DURCH AUSTAUSCH VON KOMPLETTEN HAIRPINS

Um den Einfluss der Hairpin-Stabilität auf die Translationseffizienz der gesamten 5'-UTR weiter zu untersuchen, wurden in einem nächsten Schritt die Hairpins von GP und VP24 mit dem jeweils anderen Hairpin ausgetauscht (Abbildung 65). Es zeigt sich, dass der schwächere Hairpin von VP24 in der 5'-UTR von GP keine zusätzliche Abhängigkeit von der Helikaseaktivität des Initiationsfaktors eIF4A verursacht. Beim Austausch des VP24 Hairpins gegen den von GP hingegen, kann fast eine Verdopplung dieser Abhängigkeit beobachtet werden. Die Kombination der insgesamt längeren 5'-UTR von VP24 mit dem in sich stabileren Hairpin von GP zeigt eine klare Verstärkung des Effekts von Silvestrol auf die Translationseffizienz.

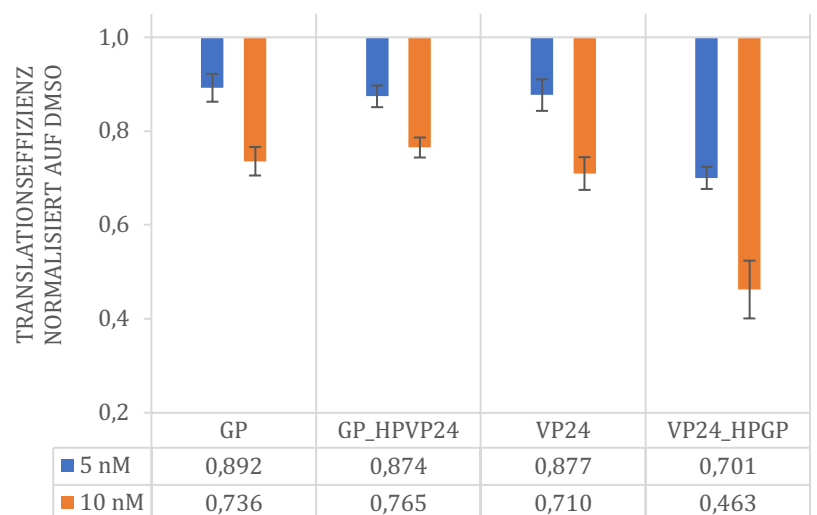


Abbildung 65: Silvestrolwirkung auf mutierte 5'-UTRs von GP und VP24. DLA in HepG2 nach 48 Stunden Inkubation und Behandlung mit 5 nM und 10 nM Silvestrol, normalisiert auf DMSO-Kontrollen. (SEM; n = 4 bis 24) [erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Wiebke Obermann]

DELETION DES NP UND VP35 5'-HAIRPINS

Der Austausch des VP24 Hairpins gegen den stärkeren GP-Hairpin zeigt, dass ein Hairpin die eIF4A-Abhängigkeit der Translations-effizienz deutlich verändern kann. Nun stellt sich die Frage, ob die Deletion eines vergleichsweise schwachen Hairpins aus einer langen 5'-UTR, wie der von NP, die Translation ebenso verändert; und wie es sich mit einem schwachen Hairpin einer kurzen 5'-UTR verhält, z.B. VP35.

Hierzu wurden die 5' terminalen Hairpin-Strukturen der 5'-UTRs von NP und VP35 deletiert.

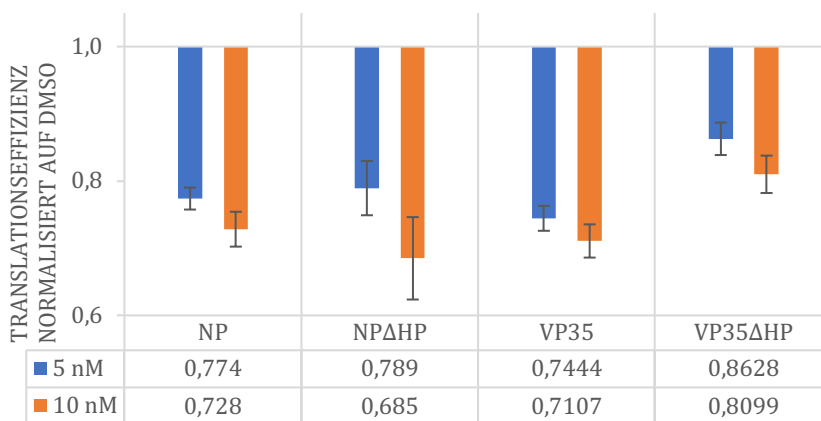


Abbildung 67: eIF4A Abhängigkeit bei deletierter Hairpin-Struktur. DLA in HepG2 nach 48 Stunden Inkubation und Behandlung mit 5 nM und 10 nM Silvestrol, normalisiert auf DMSO-Kontrollen. (SEM; n = 8 bis 16) [erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Wiebke Obermann]

Man erkennt, dass bei der NP 5'-UTR die eIF4A-Abhängigkeit nicht, oder nur gering von der Hairpin-Struktur abhängig ist. Hingegen zeigt sich nach Deletion des 5'-terminalen Hairpins in der VP35 5'-UTR eine deutliche Reduktion dieser Abhängigkeit von der Helikase (Abbildung 67). Liegt die Translationseffizienz durch die eIF4A Inhibition bei der nativen, unveränderten Sequenz noch unter 75 % bei 5 nM bzw. 71 % bei 10 nM Silvestrol Konzentration, verglichen mit der Effizienz der DMSO-Kontrolle, so lässt diese Wirkung bei deletiertem Hairpin nach, und die Translationseffizienz steigt wieder auf 81 % bzw. 86 % bezogen auf die DMSO-Kontrolle.

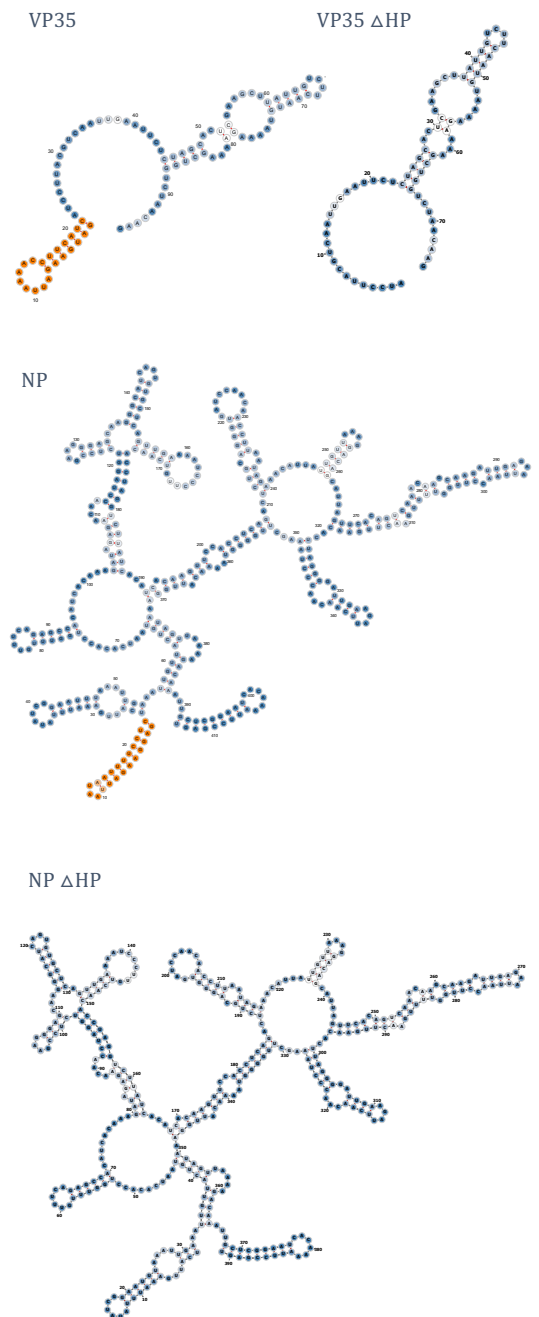


Abbildung 66: Vorhersagen der Sekundärstrukturen der VP35, VP35ΔHP, NP und NPΔHP 5'-UTRs. Orange hervorgehoben sind die jeweiligen Hairpin-Strukturen. MEF: VP35 ΔHP (-7,2 kcal/mol), NP ΔHP (-89,9 kcal/mol). MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)

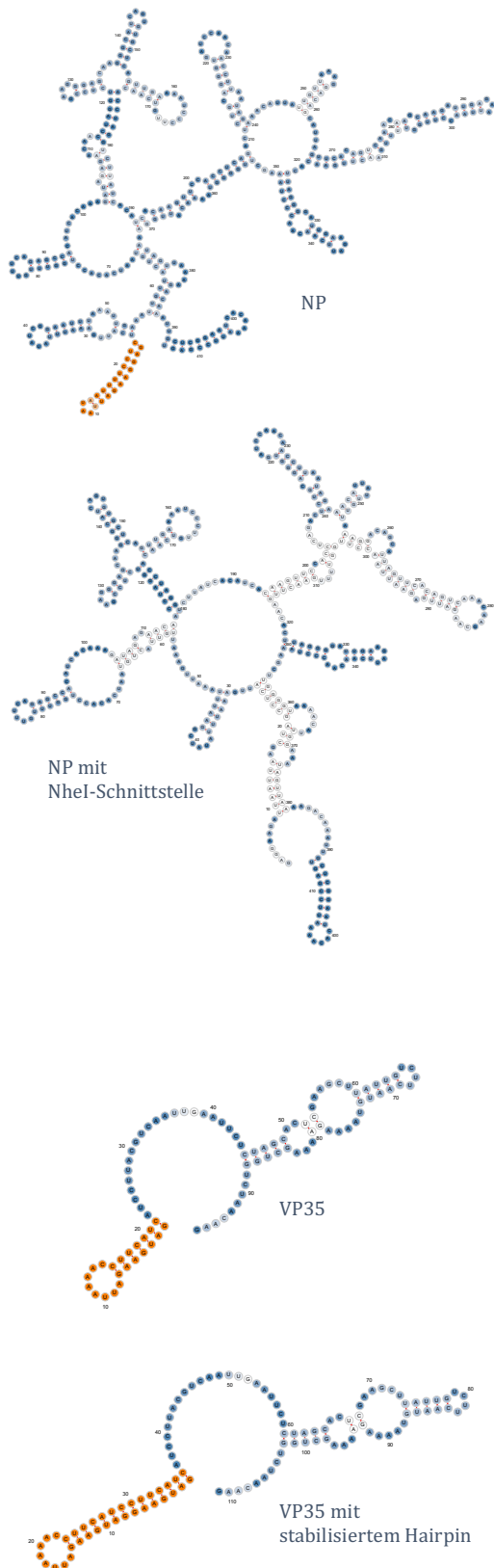


Abbildung 68: Vorhersagen der Sekundärstrukturen der 5'-UTRs von NP, NP mit NheI-Schnittstelle, VP35 und VP35 mit stabilisiertem Hairpin. Orange hervorgehoben sind die jeweiligen Hairpin-Strukturen. MEF: NP mit NheI-Schnittstelle (-92,3 kcal/mol), VP35 mit stabilisiertem Hairpin (-30,2 kcal/mol). MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/NAWebSuite/RNAfold.cgi>)

MODIFIKATION AM HAIRPIN

Nachdem der Austausch eines vollständigen Hairpins die Abhängigkeit der Translationsinitiation von eIF4A im Kontext der restlichen 5'-UTR durchaus beeinflussen kann, soll nun geprüft werden, ob eine Modifikation innerhalb des Hairpins zu einer Veränderung führen kann. Eine in der Ebola-Forschung häufig genutzte Modifikation des 5' terminalen Hairpins der NP 5'-UTR ist die Einführung einer NheI-Schnittstelle. Bei dieser Veränderung der Sequenz kann man bei der höheren Silvestrol-Konzentration, also einer starken Inhibition der eIF4A vermittelten Helikase-Aktivität, einen Verlust der Translationseffizienz von 72 % auf 60 % der DMSO-Kontrolle beobachten. Bei Betrachtung der Strukturvorhersage für die gesamte 5'-UTR zeigt sich aber, dass die Einführung der NheI-Schnittstelle in den Hairpin zu einer nahezu vollständigen Umstrukturierung führt. Eine Aussage über den Einfluss der Veränderung in der Hairpin-Struktur lässt sich also nicht isoliert treffen.

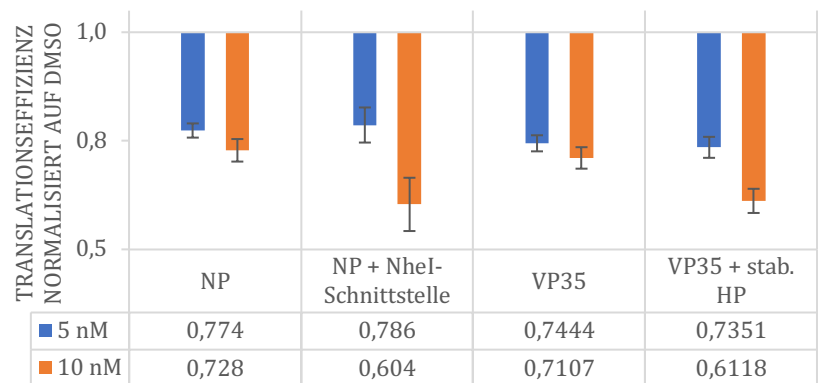


Abbildung 69: Einfluss von Modifikationen der Hairpin-Strukturen bei NP und VP35. DLA in HepG2 nach 48 Stunden Inkubation und Behandlung mit 5 nM und 10 nM Silvestrol, normalisiert auf DMSO-Kontrollen. (SEM; n = 8 bis 16) [erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Wiebke Obermann]

Einen anderen Ansatz verfolgt daher die Modifikation am VP35 Hairpin. Hier wird die Stem-Region gezielt verlängert und der gesamte Hairpin somit stabilisiert, ohne dass Auswirkungen auf die Sekundärstruktur der restlichen 5'-UTR zu befürchten sind.

Die Stabilisierung des VP35 Hairpins durch Verdopplung der Stem-Sequenz führt zu einer Erhöhung der eIF4A Abhängigkeit bei der

Translationsinitiation, was durch eine Verschlechterung der Translationseffizienz von 71 % auf 61 % unter 10 nM Silvestrol-Konzentration zu erkennen ist.

INDUKTION EINER EIF4A-ABHÄNGIGKEIT

In einem nächsten Schritt soll versucht werden, durch strukturelle Veränderungen einer 5'-UTR, künstlich eine eIF4A-Abhängigkeit zu induzieren. Als Ausgangssequenz dient hier die 5'-UTR von β -Globin, diese zeigt normal keine Abhängigkeit von eIF4A bei ihrer Translationsinitiation.

Zunächst wird der 5'-terminale Hairpin aus der VP35 5'-UTR vor die eigentliche β -Globin 5'-UTR kloniert. Die restliche Sequenz und Sekundärstruktur bleiben unverändert. Diese Veränderung zeigt tatsächlich eine deutliche Zunahme der eIF4A-abhängigen Translationsinitiation. Die Effektivität der Translation sinkt unter der Behandlung mit 10 nM Silvestrol von etwa 100 % bei der unveränderten β -Globin 5'-UTR auf 80 % bei der modifizierten, verglichen mit der DMSO-Kontrolle (Abbildung 71).

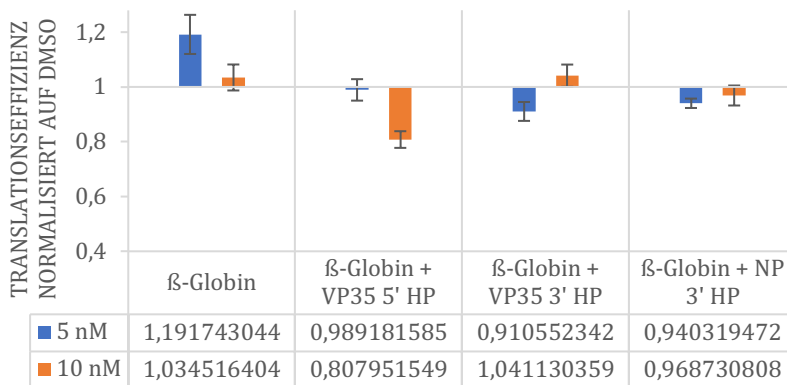


Abbildung 71: Induzierte eIF4A Abhängigkeit bei β -Globin. DLA in HepG2 nach 48 Stunden Inkubation und Behandlung mit 5 nM und 10 nM Silvestrol, normalisiert auf DMSO-Kontrollen. (SEM; n = 4 bis 12) [erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Wiebke Obermann]

Wird der gleiche Hairpin aus VP35 nicht an das 5' terminale Ende der β -Globin 5'-UTR kloniert, sondern an das 3' terminale, so verliert sich der induzierte Effekt. Auch die Insertion eines ähnlich beschaffenen Hairpins vom 3' terminalen Ende der NP 5'-UTR an das 3'-terminale Ende der β -Globin 5'-UTR zeigt keine signifikante

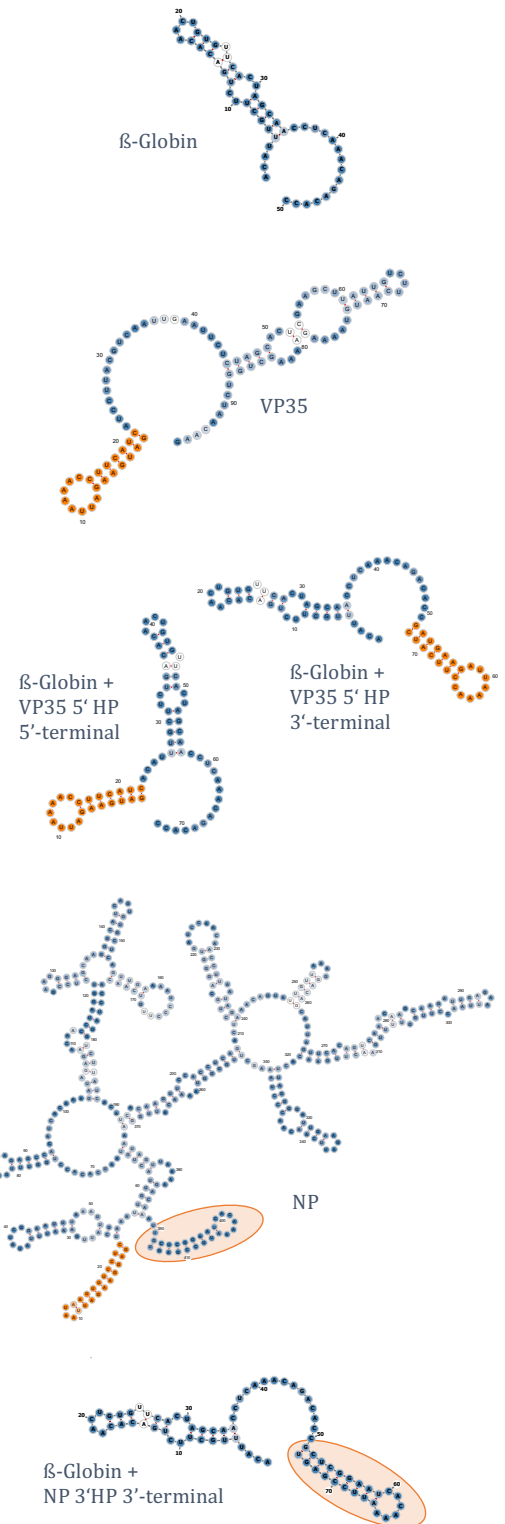


Abbildung 70: Vorhersagen der Sekundärstrukturen der 5'-UTRs von β -Globin und modifizierten β -Globin 5'-UTRs. Orange hervorgehoben sind die jeweiligen 5' terminalen Hairpin-Strukturen, eingekreist: die 3' terminale Hairpin-Struktur. MEF: β -Globin (-10,1 kcal/mol), β -Globin + VP35 5' HP 5'-terminal (-18,8 kcal/mol), β -Globin + VP35 5' HP 3'-terminal (-17,4 kcal/mol), β -Globin + NP 3' HP 3'-terminal (-21,8 kcal/mol). MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)

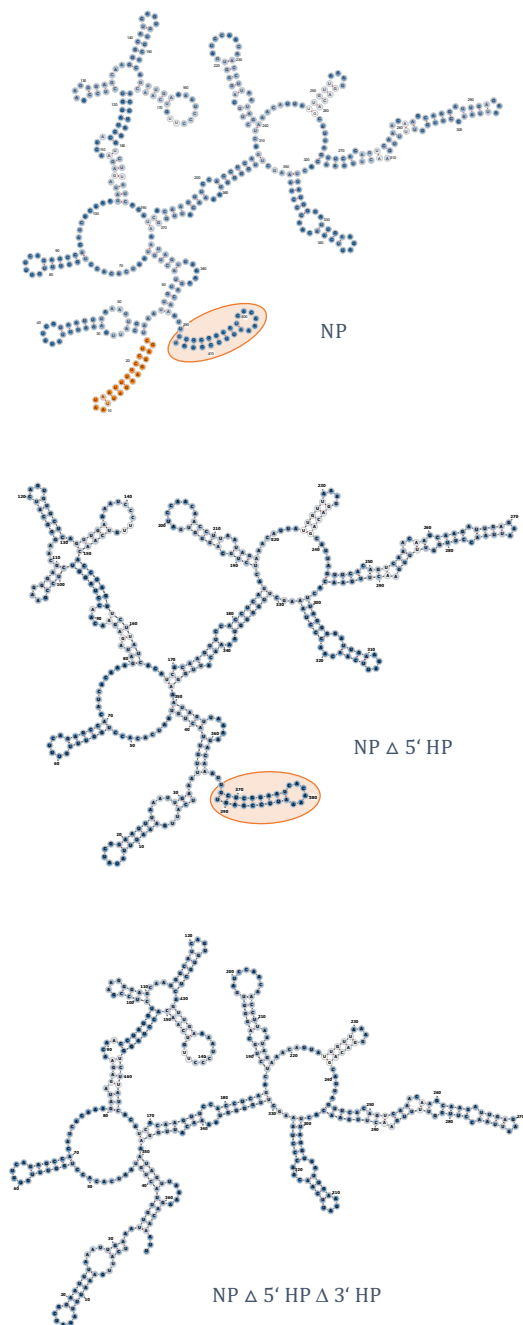


Abbildung 72: Vorhersagen der Sekundärstrukturen der 5'-UTRs von NP und Konstrukten mit deletierten Hairpin-Strukturen. Orange hervorgehoben ist die 5' terminale Hairpin-Struktur, eingekreist: die 3' terminale Hairpin-Struktur. MEF: NP (-100,4 kcal/mol), NP Δ 5' HP (-89,9 kcal/mol), NP Δ 5' HP Δ 3' HP (-78,3 kcal/mol). MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)

Erhöhung der eIF4A-Abhängigkeit. Bei beiden Konstrukten schwanken die Translationseffizienzen um 100 % in Bezug auf die DMSO behandelten Konstrukte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MFE der 5'UTRs zwar bei allen drei neuen Konstrukten sinkt (von -10,1 kcal/mol beim unveränderten β-Globin, über -18,8 kcal/mol beim 5' terminalen HP von VP35, bis hin zu -21,8 kcal/mol beim 3'-terminalen HP von NP), doch entscheidend scheint die Einführung eines Hairpins am 5' terminalen Ende der 5'-UTR zu sein.

DELETION 3'-TERMINALER HAIRPIN-STRUKTUREN

Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion des schwachen 5'-terminalen Hairpins der NP 5'-UTR keine signifikante Auswirkung auf die eIF4A-Abhängigkeit der Translationsinitiation hat. Nun gilt es zu klären, ob die zusätzliche Deletion des 3'-terminalen Hairpins die Translationseffizienz beeinflussen kann.

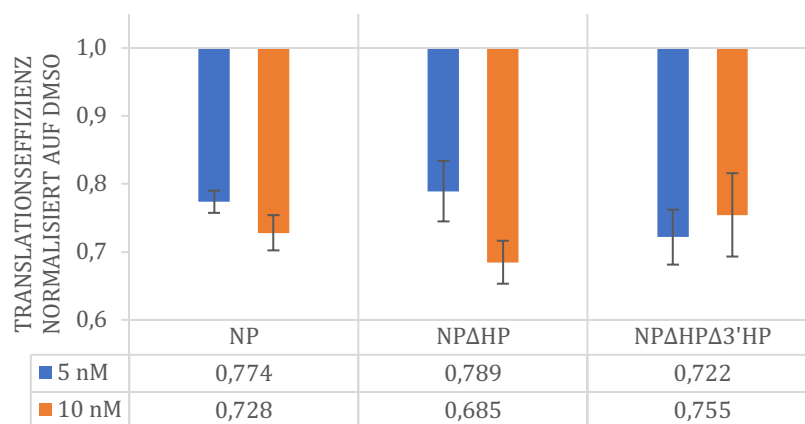


Abbildung 73: Deletion der 5'- und 3'-terminalen Hairpin-Strukturen der NP 5'UTR. DLA in HepG2 nach 48 Stunden Inkubation und Behandlung mit 5 nM und 10 nM Silvestrol, normalisiert auf DMSO-Kontrollen. (SEM; n = 4 bis 8) [erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Wiebke Obermann]

Bei Silvestrol-Konzentration von 5 nM kann man zwar einen leichten Effekt auf die Translationseffizienz des Konstrukts mit deletierten 5'- und 3'-terminalen Hairpins erkennen, doch diese geht bei der höheren Konzentration von 10 nM Silvestrol verloren. Eine zusätzliche Deletion des 3'-terminalen Hairpins scheint also keinen signifikanten Einfluss auf die eIF4A-Abhängigkeit der Translationsinitiation zu besitzen.

EIF4A: EIN TARGET FÜR EINE ANTIVIRALE BREITBANDWIRKUNG?

Aus den oben beschriebenen Daten wird deutlich, dass eine komplexe Sekundärstruktur, insbesondere ein stabiler 5'-terminaler Hairpin, die Abhängigkeit der Translationsinitiation einer 5'-UTR von eIF4A verstärken kann. Nachdem ebenfalls gezeigt werden konnte, dass sowohl die 5'-UTR vom HI-Virus als auch vom Ebola-Virus diese Eigenschaften aufweisen, ist der nächste Schritt, andere virale 5'-UTRs auf ihre eIF4A-Abhängigkeit hin zu überprüfen.

Es werden also die 5'-UTRs des Human coronavirus 229E (HCoV-229E), des Middle East respiratory syndrome-related coronavirus (MERS-CoV), des Human rhinovirus A1 (HRV-A1), des Poliovirus (PV) und des Classical swine fever virus (CSFV) getestet. HCoV-229E und MERS-CoV werden Cap-abhängig translatiert, die drei anderen Viren bedienen sich hingegen einer IRES.

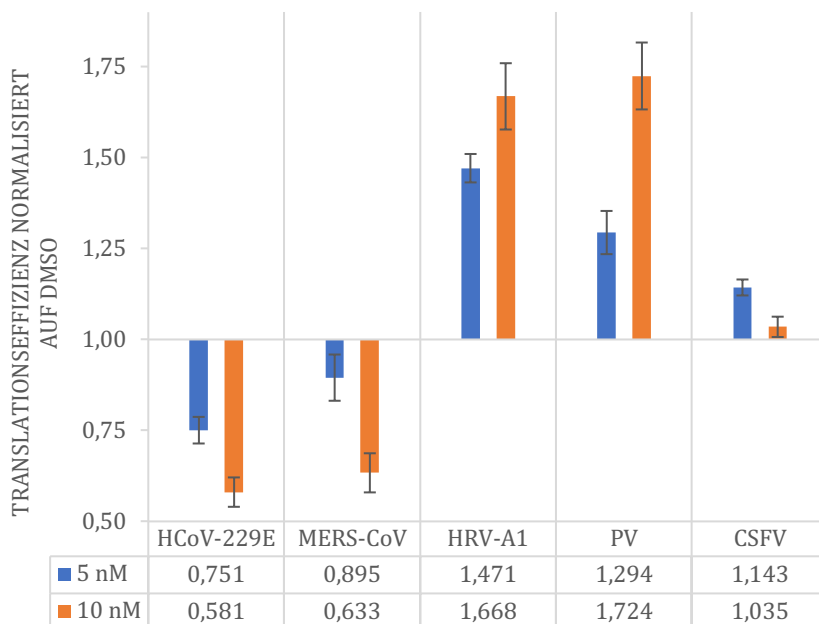


Abbildung 75: Hemmung der Translationseffizienz verschiedener viraler 5'-UTRs unter Silvestrol-Gabe. DLA in HepG2 nach 48 Stunden Inkubation und Behandlung mit 5 nM und 10 nM Silvestrol, normalisiert auf DMSO-Kontrollen. (SEM; n = 4 bis 16) [Teile erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Wiebke Obermann]

Die Cap-abhängig translatierten 5'-UTRs von HCoV-229E und MERS-CoV weisen eine starke Abhängigkeit von eIF4A auf. Die

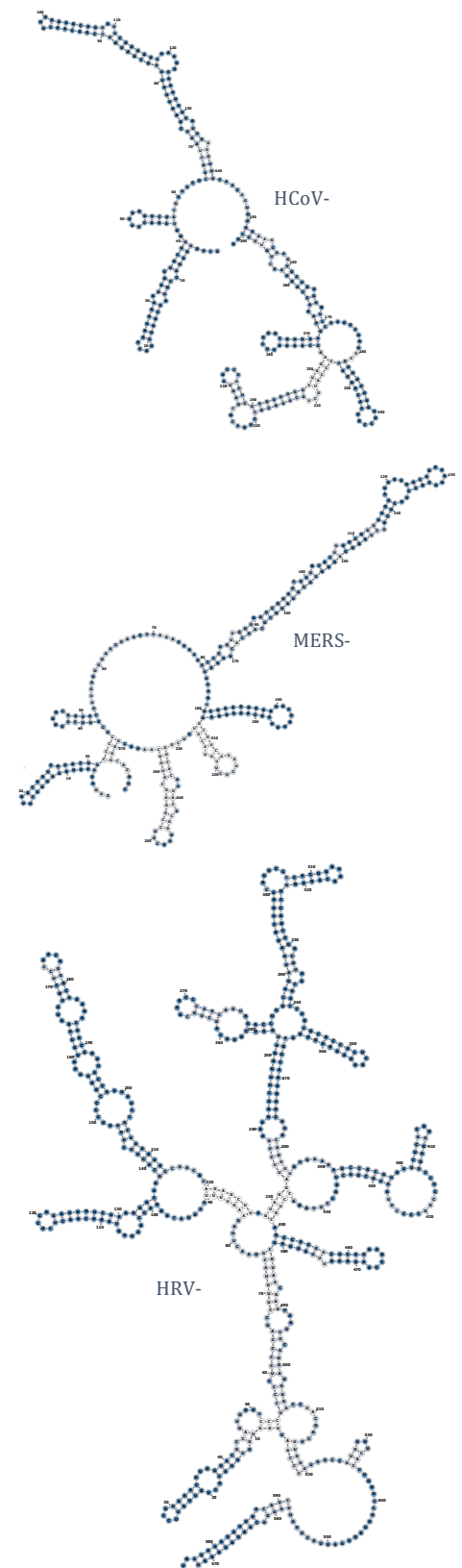


Abbildung 74: Vorhersagen der Sekundärstrukturen verschiedener viraler 5'-UTRs. MEF: HCoV-229E (-83,6 kcal/mol), MERS-CoV (-85,7 kcal/mol), HRV-A1 (-187,6 kcal/mol). MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)

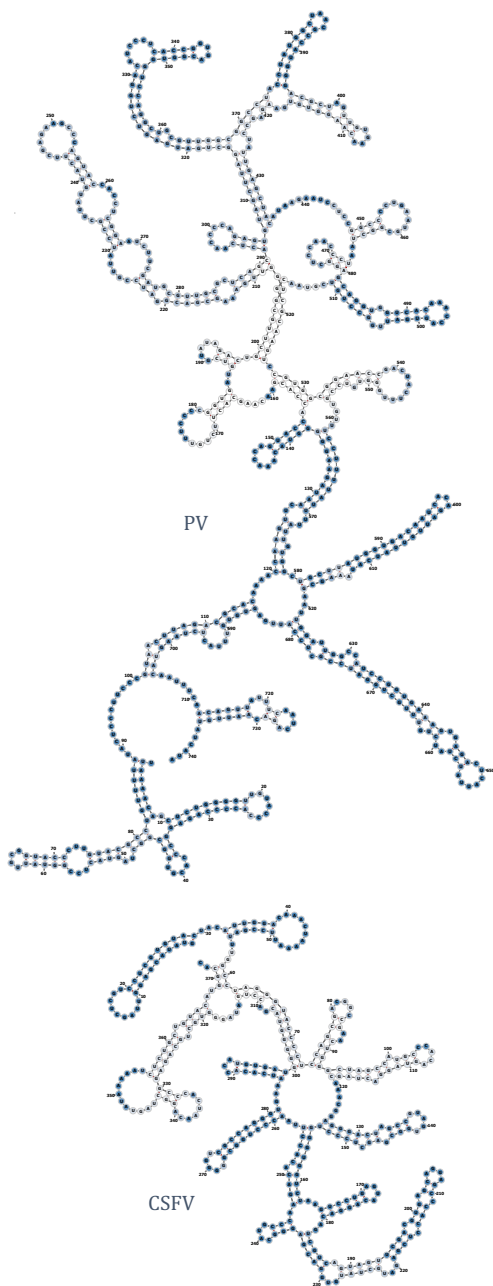


Abbildung 76: Vorhersagen der Sekundärstrukturen verschiedener viraler 5'-UTRs. MEF: PV (-256,9 kcal/mol), CSFV (-149,2 kcal/mol. MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)

Behandlung mit Silvestrol zeigt bei HCoV-229E bereits bei einer Konzentration von 5 nM eine Reduktion der Translationseffizienz auf 75 % der DMSO-Kontrolle. Bei einer Steigerung der Dosis auf 10 nM Silvestrol, kann die Effizienz auf unter 60 % vermindert werden. Dieser dosisabhängige Effekt von Silvestrol auf die Translationsinitiation, kann auch bei der 5'-UTR des MERS-HCoV beobachtet werden. Zeigt die geringere Silvestrol-Konzentration hier nur einen moderaten Effekt von 10 % Reduktion der Translationseffizienz, so steigert sich der Effekt bei 10 nM Silvestrol auf eine um über ein Drittel verminderte Effizienz, bezogen auf die DMSO behandelte Kontrolle.

Die drei anderen Konstrukte, die über eine IRES verfügen, zeigen im DLA keine Defizite in ihrer Translationseffizienz. Die 5'-UTRs von HRV-A1 und PV zeigen sogar eine deutliche Steigerung in ihrer Translation. Jedoch ist die Auswertung von IRES enthaltenden 5'-UTRs in diesem Assay problematisch, da auch die interne Kontrolle, die Renilla-Luciferase, über eine IRES, nämlich die des Hepatitis C virus (HCV) reguliert wird. So deuten Daten aus der Zellkultur nicht nur auf einen tatsächlichen antiviralen Effekt von Silvestrol für HCoV-229E und MERS-CoV, sondern eben auch bei HRV-A1 und PV hin (Müller et al., 2018); obgleich sich im DLA sogar eine Erhöhung der Translationseffizienz auf etwa 150 % bzw. 170 % bei HRV-A1 und etwa 130 % bzw. 170 % bei PV gegenüber der DMSO-Kontrolle darstellt. Es bleibt also festzuhalten, dass die Aussagekraft des DLAs bei Cap-abhängig translatierten 5'UTRs sehr gut ist, aber bei solchen keine zuverlässigen Vorhersagen liefert, die eine IRES enthalten.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Silvestrol eine breite antivirale Wirkung zeigt. Bei Viren mit cap-abhängig translatierten 5'-UTRs lässt sich diese im hier verwendeten DLA darstellen. Die Wirkung auf solche Viren, die IRES-abhängig translatiert werden, ist abhängig von der jeweiligen IRES und methodisch bedingt nicht im DLA zu überprüfen.

Die Hemmung des eukaryotischen Initiationsfaktors 4A führt bei einer Vielzahl von Viren zu einer verminderten Translationseffi-

zienz. Weiterführende Infektions-Experimente bestätigen, dass die im Dual-Luciferase-Assay beobachtete Wirkung auf die Translationseffizienz, mit einer antiviralen Wirkung bei den verschiedenen Virustypen korreliert (Biedenkopf et al., 2017; Müller et al., 2018).

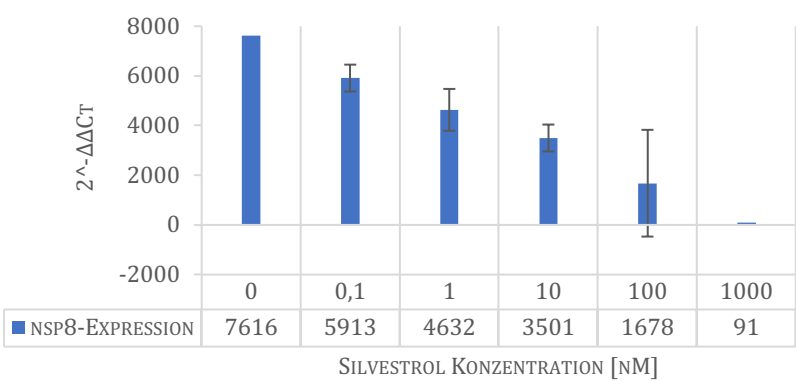


Abbildung 78: Expression der viralen nsp8 mRNA-Spiegel unter Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Silvestrol. MRC-5 Zellen wurden bei einer MOI von 0,1 mit HCoV-229E infiziert und die RNA 24 Stunden p.i. isoliert. Die Auswertung erfolgt gegen β -Aktin und nicht infizierte Zellen. (0 nM und 1000 nM n=1, 0,1-100 nM n=2) [Die Zellkulturarbeiten für dieses Experiment wurden durch C. Müller in der Virologie Gießen unter S2 Bedingungen durchgeführt.]

Der Effekt von Silvestrol auf die Translation wirkt sich auch auf die viralen RNA-Spiegel in den Wirtszellen aus. Die Verringerung der Translationseffizienz der viralen Proteine, führen zu einer Reduktion der Replikationsgeschwindigkeit und damit zu einer messbar geringeren Menge an (+)-Strang RNA in den infizierten Zellen. In mit Silvestrol behandelten HCoV-229E infizierten MRC-5 Zellen, kann 24 Stunden nach Infektion eine dosisabhängige Hemmung der nsp8 mRNA-Spiegel beobachtet werden (Abbildung 78). Der IC₅₀ liegt bei 101,9 nM Silvestrol (Abbildung 77).

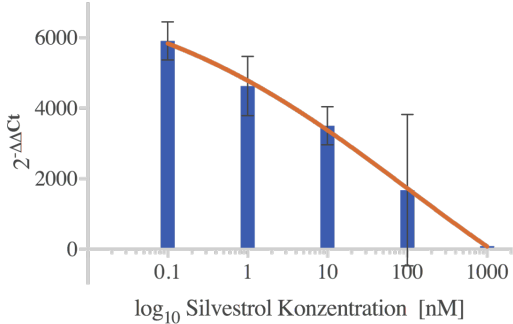


Abbildung 77: IC₅₀ von Silvestrol in HCoV-229E infizierten MRC-5 Zellen. Auswertung der nsp8 mRNA Expression in MRC-5 Zellen 24 Stunden nach Infektion mit HCoV-229E durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Software Prism7.

ZYTOTOXISCHE EIGENSCHAFTEN VON SILVESTROL

Nachdem die antivirale Wirksamkeit von Silvestrol sowohl im Dual-Luciferase-Assay als auch in verschiedenen Zellkulturexperimenten bestätigt werden konnte, gilt es nun sich der toxikologischen Aspekte anzunehmen.

TOXIZITÄT IN KREBSZELLINIEN

Da Silvestrol nicht nur eine antivirale, sondern auch eine antitumorale Wirkung zeigt, ist es notwendig Krebszelllinien und primäre Zellen bezüglich einer zytotoxischen Wirkung von Silvestrol differenziert zu betrachten.

AUSWIRKUNG AUF DIE PROLIFERATION

Eine Behandlung mit Silvestrol zeigt bei den Krebszelllinien, wie erwartet, bereits früh eine hemmende Wirkung auf die Proliferation bzw. die Zellviabilität. Bei den hier durchgeführten WST-1 Assays werden durch eine Farbreaktion die Funktion der mitochondrialen Atmungskette quantifiziert; damit kann indirekt auf die Anzahl der Zellen geschlossen werden. Bei allen drei getesteten Zelllinien (Abbildung 79) liegt die berechnete Konzentration, bei der 50 % der Zellen abgetötet werden, um 20 nM Silvestrol. Die bei dem Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen hauptsächlich verwendeten Konzentrationen von 5 nM und 10 nM liegen damit in einem unbedenklichen Bereich.

CHARAKTERISIERUNG DER TOXISCHEN EFFEKTE

Um auftretende toxische Effekte besser einschätzen zu können, werden verschiedene Zelllinien in einem weiterführenden Assay untersucht. Bei diesem Assay werden in der gleichen Probe neben der Zellviabilität und -toxizität auch die Caspase 3/7-Aktivität bestimmt. Die Zellviabilität wird anhand eines membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffes gemessen, der durch eine Protease (Cathepsin C) im Zytoplasma in seine aktive Form überführt wird. Verliert die Zellmembran beim Absterben ihre Membranintegrität,

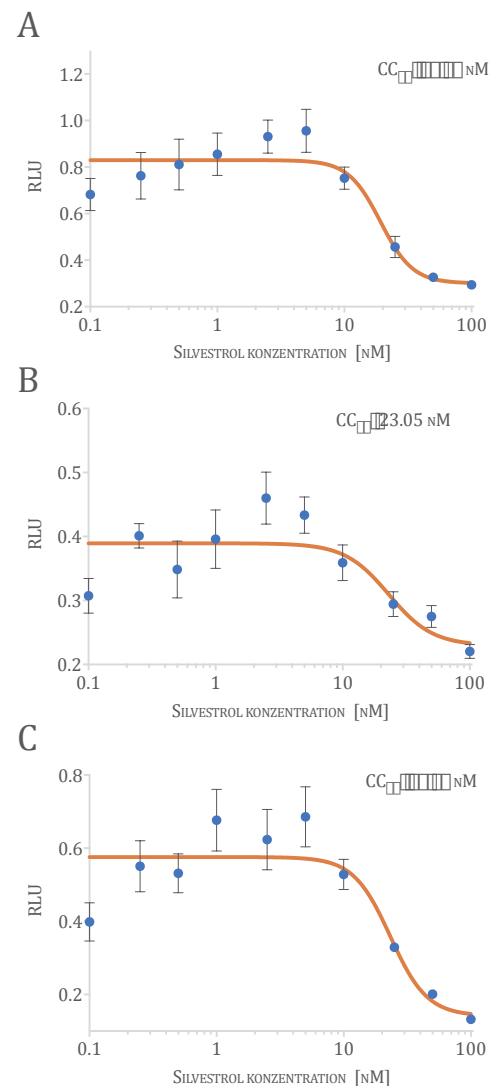


Abbildung 79: Zellviabilität von Krebszelllinien unter Silvestrol Behandlung. WST-1 Assay nach 48 Stunden Behandlung mit angegebener Konzentration Silvestrol **A:** HepG2 (n=8); **B:** HUH-7 (n=6-8); **C:** LS174T (n=8). Auswertung durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Software Prism7.

so ist diese Protease nicht mehr aktiv und der Farbstoff gibt kein Fluoreszenzsignal ab. Die Zytotoxizität hingegen wird bestimmt, indem die Vorstufe eines Fluoreszenzfarbstoffs zu den Zellen gegeben wird. Die zur Aktivierung notwendigen Proteasen (Tripeptidyl peptidase II) sind nicht membrangängig, dringen aber beim Zelluntergang durch die durchlässig gewordene Zellmembran aus der Zelle aus und aktivieren das Reagenz. Als letztes wird die Apoptose mit Hilfe der Lumineszenz ermittelt, hierzu dient ein luminogenes Caspase3/7-Substrat. Bei induzierter Apoptose werden die Caspasen aktiviert und spalten so auch das markierte Substrat. (Niles et al., 2007; Promega Corporation, 2015)

Für verschiedene Zellkulturexperimente unserer kooperierenden Arbeitsgruppen aus der Virologie, ist die Zelllinie A549 ein häufig gewähltes System für Infektionsmodelle. Daher wurde diese Zelllinie in unsere toxikologischen Untersuchungen mit einbezogen.

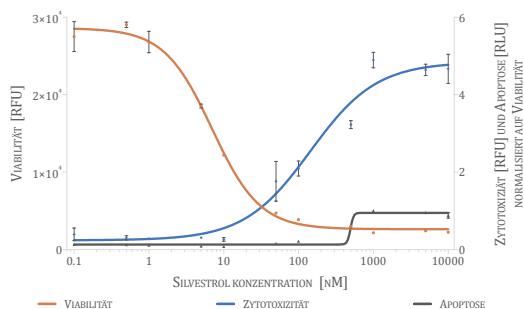


Abbildung 80: Auswertung der Toxikologie von A549-Zellen. Auswertung durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Software Prism7.

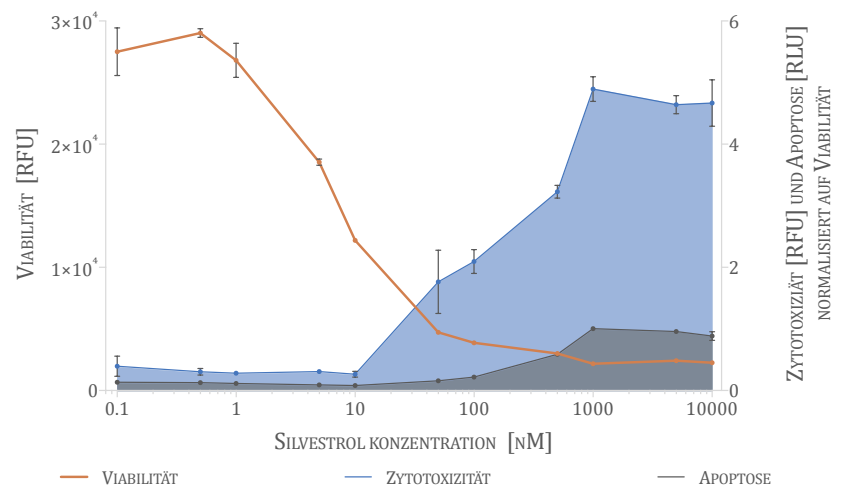


Abbildung 81: Toxikologisches Profil der Zelllinie A549. ApoTox-Glo® Triplex Assay nach 48 h Inkubation mit verschiedenen Silvestrol-Konzentrationen. Die Behandlung zeigt eine zytotoxische Reaktion, mit spät einsetzender und moderater Caspase-Aktivierung. 5000 A549-Zellen/well; n = 3

Bei dieser epithelialen Lungen-Zelllinie zeigt sich eine zytotoxisch geprägte Reaktion bei steigender Silvestrol-Konzentration. Oberhalb einer Konzentration von 10 nM, beginnt die Zytotoxizität zu steigen aber es kommt erst sehr spät zu einer moderaten Caspase-Aktivierung (Abbildung 80 und Abbildung 81). Diese Zytotoxizität, ohne nennenswerte apoptotische Phase, deutet auf ein primär nekrotisches Toxizitätsbild hin.

Anders bei der Zelllinie HepG2: Hier kommt es früh zu einer ansteigenden Caspase-Aktivität, zusammen mit einer drastischen und schnellen Zunahme der Zytotoxizität. Bei Konzentrationen über 100 nM Silvestrol erkennt man, dass die Zytotoxizitäts-Marker stark abfallen, was auf eine akute nekrotische Reaktion kurz nach Behandlungsbeginn deutet. Zusammengenommen deutet dies auf eine Apoptose-Induktion mit steigender Silvestrol-Konzentration hin, das Maximum der Caspase-Aktivität wird bei etwa 80 nM Silvestrol erreicht. (Abbildung 82 und Abbildung 83).

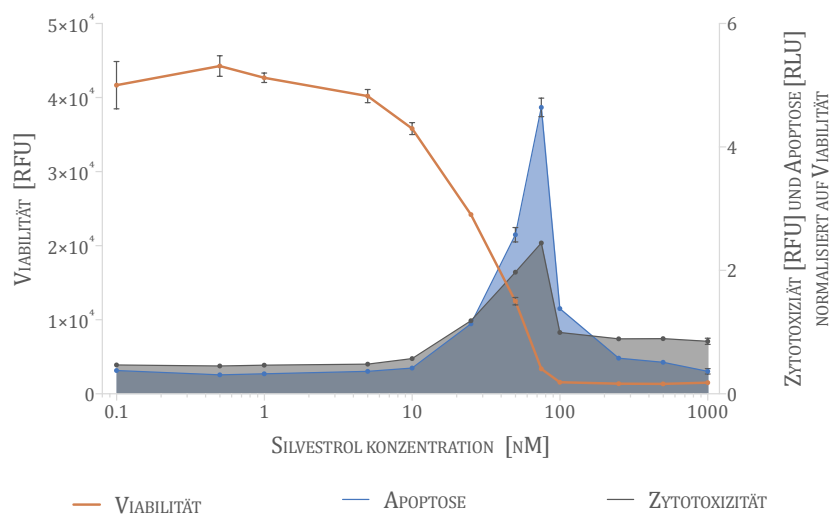


Abbildung 83: Toxikologisches Profil der Zelllinie HepG2. ApoTox-Glo® Triplex Assay nach 48 h Inkubation mit verschiedenen Silvestrol-Konzentrationen. Die Behandlung zeigt eine akute nekrotische Reaktion bei Konzentrationen über 20 nM eingeleitet durch einen deutlichen Anstieg der Caspase-Aktivität. 5000 HepG2-Zellen/well; n = 3

Bei den beiden zuvor beschriebenen Zelllinien nimmt die Proliferation von Beginn an mit ansteigender Dosis ab. Bei LS174T-Zellen bleibt diese jedoch bis zu einer Konzentration von 10 nM konstant. Bei einer Silvestrol-Konzentration von 10 nM kommt es dann zu einer Zunahme der Proliferation. Steigt die Konzentration weiter, tritt ein zunehmend zytotoxischer Verlauf ein. Ab 75 nM Silvestrol beobachtet man, ähnlich wie bei HepG2-Zellen, eine akut nekrotische Reaktion mit massivem Anstieg der Caspase-Aktivität in den noch verbliebenen Zellen (Abbildung 84 und Abbildung 85).

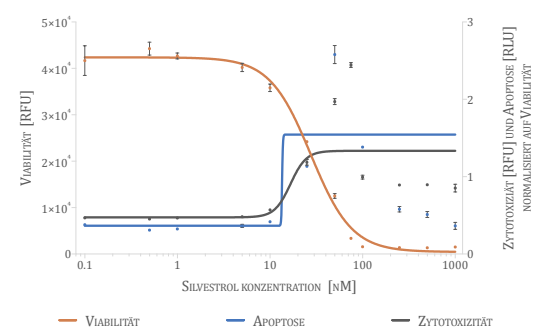


Abbildung 82: Auswertung der Toxikologie von HepG2-Zellen. Auswertung durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Software Prism7.

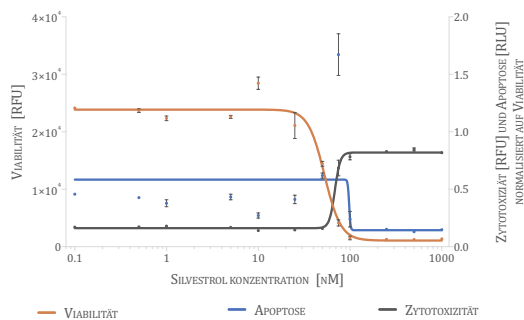


Abbildung 84: Auswertung der Toxikologie von LS174T-Zellen. Auswertung durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Software Prism7.

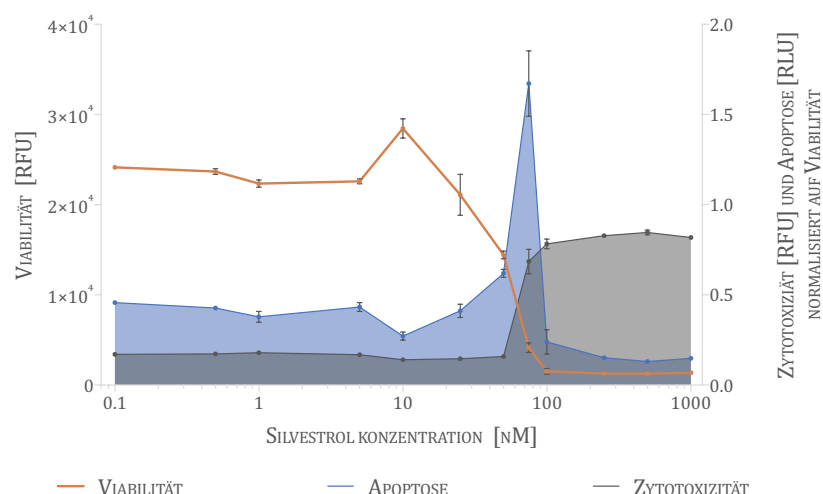


Abbildung 85: Toxikologisches Profil der Zelllinie LS174T. ApoTox-Glo® Triplex Assay nach 48 h Inkubation mit verschiedenen Silvestrol-Konzentrationen. Die Behandlung bewirkt bei einer Konzentration von etwa 10 nM eine Induktion der Proliferation. Bei höheren Konzentration ab etwa 75 nM kommt es, wie bei HepG2, zu einer akuten nekrotischen Reaktion, begleitet von einem deutlichen Anstieg der Caspase-Aktivität. 5000 LS174T-Zellen/well; n = 3

Je nach untersuchter Zelllinie sind die beobachteten toxischen Reaktionen der Zellen auf eine Behandlung mit Silvestrol unterschiedlich stark ausgeprägt. In den meisten Krebszelllinien lässt sich aber ab einer Konzentration über 10 nM eine zytotoxische Wirkung beobachten.

TOXIZITÄT IN PRIMÄREN ZELLEN

Da primäre Zellen keinen entarteten Stoffwechsel aufweisen, entsprechend auch keine Proto-Onkogene überexprimiert werden, werden hier die toxischen Effekte erst deutlich später erwartet. Als Modellsysteme nutzen wir hier sowohl *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) und aus Monozyten differenzierte Makrophagen. Bei beiden Zelltypen handelt es sich um humane Zellen, isoliert aus so genannten *buffy coats* verschiedener Blutspender. Um das hohe Maß an intraindividuellen Schwankungen zwischen den einzelnen Spendern auszugleichen, bedarf es einer Vielzahl an Spendern für die einzelnen Experimente.

PBMCS

Bei PBMCs handelt es sich um ein heterogenes Gemisch, bestehend aus Monozyten, wenigen Dendritischen Zellen und hauptsächlich Lymphozyten. Um die längerfristigen Auswirkungen einer Silvestrol-Behandlung auf diese Immunzellen beurteilen zu können, wurden PBMCs verschiedener Spender mit unterschiedlichen Silvestrol-Konzentrationen und einer DMSO-Kontrolle behandelt. Da sich primäre Zellen nicht teilen, wird hier die Viabilität, nicht aber die Proliferation beurteilt. Die Messung erfolgt durch Zugabe der Vorstufe eines Luciferase-Substrates, welches durch die Zellmembran in die lebende Zelle diffundieren kann und dort aktiviert wird. Das aktivierte Substrat wird wieder aus der Zelle transportiert und durch die Luciferase im Medium umgesetzt.

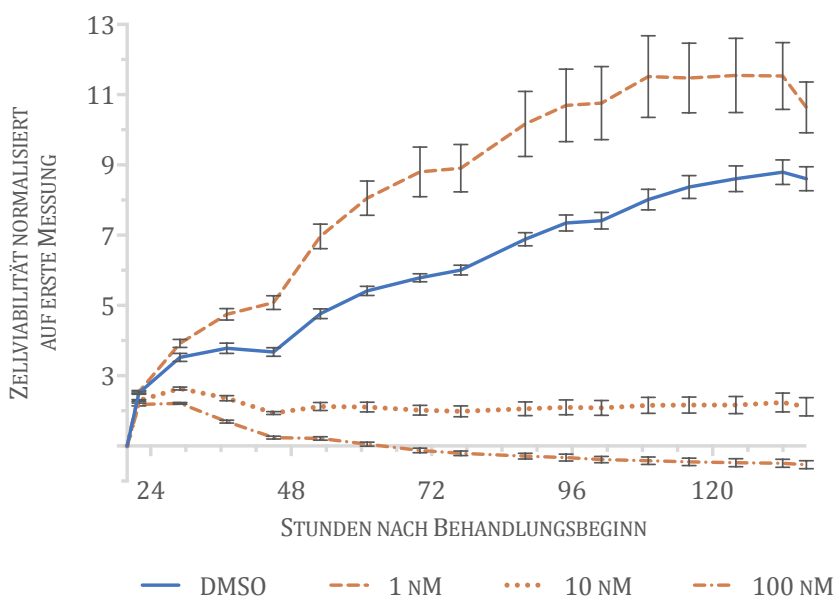


Abbildung 86: Einfluss von Silvestrol auf PBMCs. RealTime-Glo® MT Cell Viability Assay als Langzeitmessung zur Bestimmung der Auswirkung unterschiedlicher Silvestrol-Konzentrationen auf die Zellviabilität von PBMCs. Die niedrigste getestete Konzentration (1 nM) zeigt einen induktiven Effekt auf die Zellviabilität. Unter 10 nM Silvestrol-Konzentration zeigt sich eine Reduktion der Viabilität, bei 100 nM treten toxische Effekte auf. Bei allen Konzentrationen setzt die Wirkung von Silvestrol erst nach mehr als 24 Stunden ein. PBMCs aus einem Pool von 6 Spendern in einem Experiment. (n=18)

Man erkennt, dass bei der 1 nM Silvestrol-Konzentration die Viabilität leicht erhöht ist, im Vergleich zu der mit DMSO behandelten Kontrolle. Es kommt bei einer Erhöhung der Konzentration auf 10 nM zu einer klaren Reduktion der Zellviabilität, die aber in

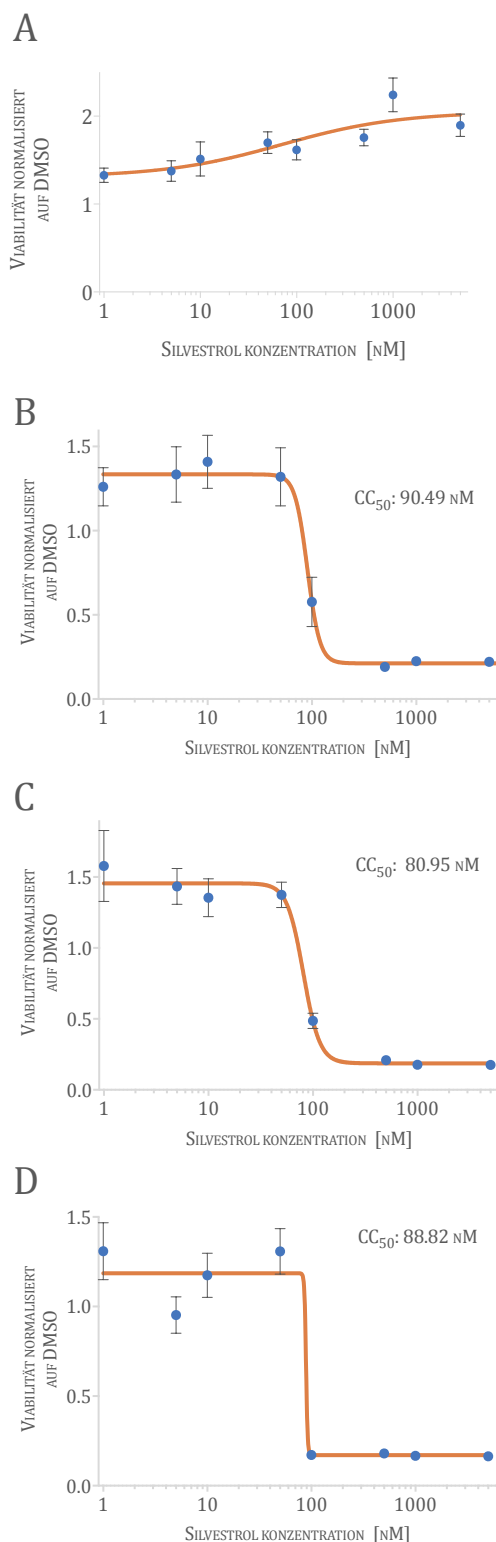


Abbildung 87: Zellviabilität von Makrophagen unter Silvestrol-Behandlung. WST-1 Assay nach verschiedenen Inkubationszeiten bei Silvestrol- bzw. DMSO-Behandlung. **A:** 24 h, n=24; **B:** 48 h, n=8; **C:** 72 h, n=24; **D:** 96 h, n=24 Die Auswertung erfolgt durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Software Prism7.

ihrem Ausmaß über den gesamten Versuchszeitraum konstant bleibt. Bei einer Gabe von 100 nM Silvestrol im Medium kommt es, wie zu erwarten, zu toxischen Effekten auf die PBMCs und damit zu einem kontinuierlichen Abfall der Viabilität. Interessant ist hier zu beobachten, dass ein toxischer Effekt, unabhängig von der untersuchten Konzentration frühestens nach 24 Stunden in Erscheinung tritt.

MAKROPHAGEN

Neben PBMCs sind Makrophagen, die aus Monozyten differenziert werden, ein wichtiges Zellsystem für die Untersuchung von Silvestrol als antiviraler Wirkstoff. So sind Makrophagen einer der ersten Zelltypen, die bei einer Infektion mit dem Ebola Virus infiziert werden. In diesem Zusammenhang wurden daher die zytotoxischen Konzentrationen CC_{50} von Silvestrol in Makrophagen bei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

24 Stunden nach Behandlungsbeginn sind noch keine toxischen Effekte messbar (Abbildung 87), ähnlich der Beobachtung bei den PBMCs. Nach 48 Stunden zeigt sich eine Wirkung auf die Zellviabilität bei einer CC_{50} von etwa 90 nM. Es kommt zwar im weiteren Verlauf zu Schwankungen der CC_{50} -Werte, allerdings fällt sie nicht unter 80 nM Silvestrol und liegt am Ende des Experiments, 96 Stunden nach Behandlungsbeginn, bei rund 88 nM.

Zusammengefasst kann man feststellen, dass, wie bereits bei der Untersuchung der PBMCs, auch bei Makrophagen ein toxischer Effekt erst nach 24 Stunden sichtbar wird, dieser dann aber in seiner Ausprägung konstant zu bleiben scheint.

SILVESTROL-ANALOGA

Silvestrol stellt einen sehr potenten und selektiven Inhibitor des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF4A dar. Doch die Komplexität dieses Naturstoffes ist eine Herausforderung für die Synthese in einem möglichen industriellen Herstellungsverfahren.

Unabhängig von den hervorragenden Inhibitor-Eigenschaften, die Silvestrol zweifelsohne besitzt, bleibt eIF4A der entscheidende Ansatzpunkt für eine neue antivirale Therapiestrategie, nämlich die Hemmung eines Wirtsproteins. Dieser Ansatz macht eine schnelle Anpassung des Virus durch Mutationen nahezu unmöglich, wie sie häufig bei bekannten antiviralen Therapeutika beobachtet werden muss.

Diesem Gedanken folgend, werden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schlitzer (Philipps-Universität Marburg) zunächst *in silico* Moleküle gesucht, die in Geometrie und elektronischen Eigenschaften vergleichbar mit Silvestrol sind. Identifizierte Leitstrukturen werden dann synthetisiert und weiter modifiziert, um sie im Hinblick auf Toxizität und Wirksamkeit weiter zu optimieren.

In diesem Abschnitt werden neben den eigentlichen Testergebnissen auch die Assays beschrieben, die für diese Aufgabenstellung verwendet wurden und wie diese im Verlauf der Arbeit angepasst und weiterentwickelt werden konnten. Ziel ist es auch, einen Assay zu entwickeln, der es ermöglicht, nach selektiven eIF4A-Inhibitoren durch den Einsatz eines High-Throughput Screenings zu suchen. Ein möglicher Kooperationspartner ist hier der Fraunhofer IME ScreeningPort in Hamburg. Eine bestehende Kooperation mit Prof. Parnham vom Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME), Bereich Translationale Medizin und Pharmakologie (TMP), in Frankfurt zeigte hier mögliche Schnittstellen auf.

SULFONAMID-DERIVATE

Patrik Menzel, ein Masterstudent aus der Arbeitsgruppe von Prof. Schlitzer, hat sich in seiner Arbeit mit Sulfonamid-Derivaten beschäftigt und eine Vielzahl von Derivaten synthetisiert. Im Anschluss wurden die toxikologischen und funktionellen Tests durchgeführt um durch ein besseres Struktur-Wirkungs-Verständnis die Strukturstrategie bei der Wirkstoffentwicklung zu verbessern.

ERSTE TESTREIHE

PM0

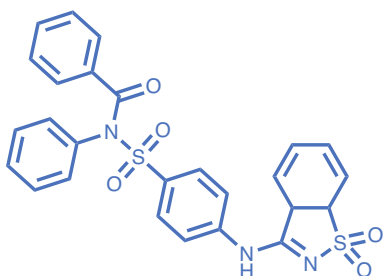
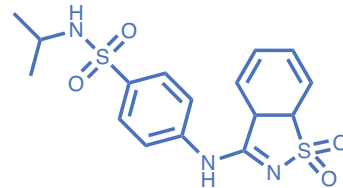
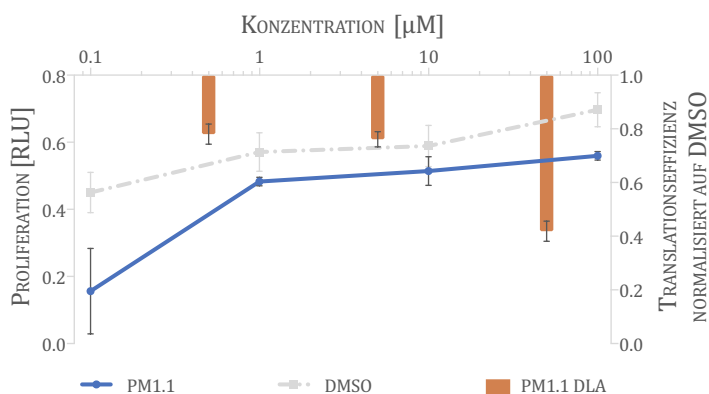


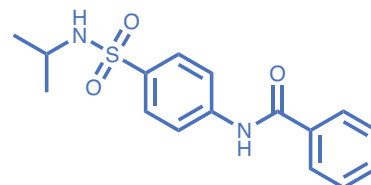
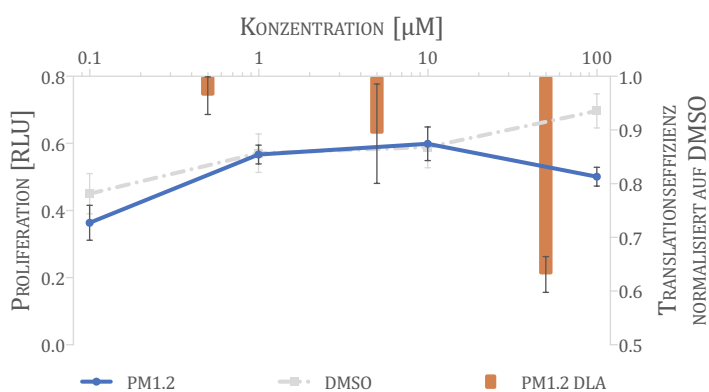
Abbildung 88: Sulfonamid-Leitstruktur.

In einer ersten Testreihe wurden vier verschiedene Derivate (**PM1.1-4**) der Sulfonamid-Leitstruktur **PM0** (Abbildung 88) untersucht. Neben der Wirkung auf die Translationseffizienz, werden auch die toxikologischen Eigenschaften der Substanzen betrachtet (Abbildung 89). Die Wirksamkeit auf die Translation wird in dem bereits beschriebenen Dual-Luciferase-Assay (DLA) mit der 5'-UTR der VP30 Ebola Virus mRNA nach 24 Stunden getestet. Hierzu werden die gemessenen Translationseffizienzen mit denen der DMSO behandelten Kontrollen verglichen. Die toxikologischen Eigenschaften wurden bei dieser ersten Testreihe durch einen WST-1 Assay, 24 Stunden nach Behandlungsbeginn, in Form des Proliferationsverhaltens der behandelten HepG2-Zellen bestimmt. Es zeigt sich, dass die toxischen Effekte aller vier getesteten Substanzen dieser Reihe moderat ausfallen und gleichzeitig eine hemmende Wirkung auf die Translationseffizienz beobachtet werden kann. Fällt die Wirksamkeit bei den ersten beiden Derivaten (**PM1.1** und **PM1.2**) in niedrigen Konzentrationen eher gering aus, so kann bei den anderen Derivaten (**PM1.3** und **PM1.4**) bereits bei einer Konzentration von 5 μM eine Reduktion der Translationseffizienz auf 50 % der DMSO-Kontrolle festgestellt werden. Die Substanz **PM1.3** zeigte sich unter den getesteten, als der am stärksten wirksame Inhibitor, bei einem gleichzeitig akzeptablen Toxizitätsprofil.

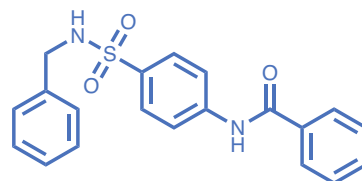
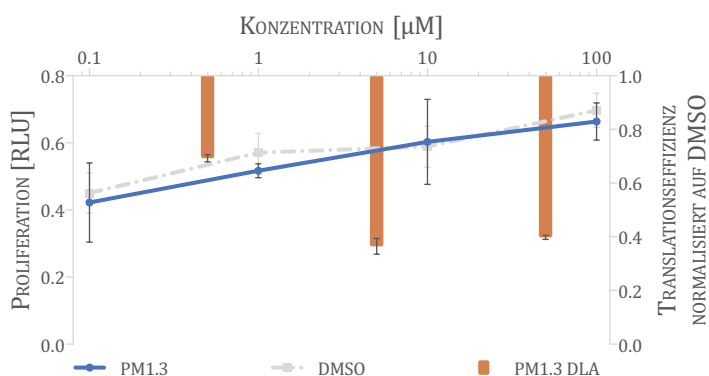
PM1.1



PM1.2



PM1.3



PM1.4

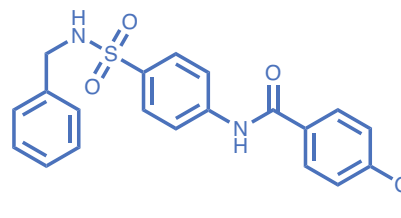
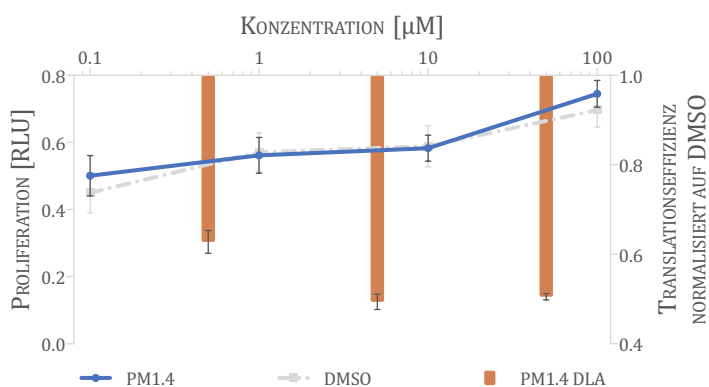
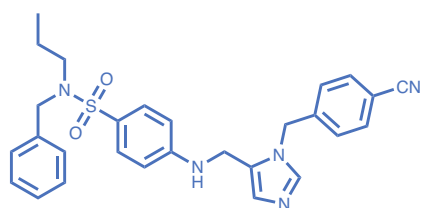


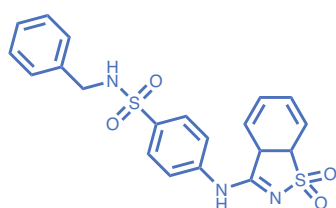
Abbildung 89: Ergebnisse aus der ersten Testreihe mit zugehörigen Strukturformeln der Sulfonamid-Derivate. WST-1 Assay zur Bestimmung der Zellproliferation nach 24 Stunden Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen (7500 HepG2-Zellen/well; n = 3; blaue Graphen, linke Y-Achse). DLA mit der 5'-UTR der VP30 EBOV mRNA zur Untersuchung der Translationseffizienz nach 24 Stunden Behandlung mit der zu untersuchenden Substanz in Konzentrationen von 0,5 μM bis 50 μM (20000 HepG2-Zellen/well; n = 3; orangene Balken, rechte y-Achse). Rechts neben den Diagrammen, die zugehörigen Strukturformeln der untersuchten Substanzen.

ZWEITE TESTREIHE

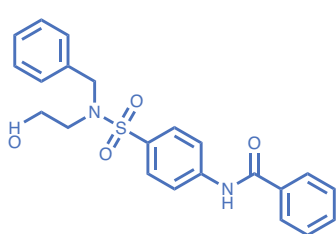
PM2.1



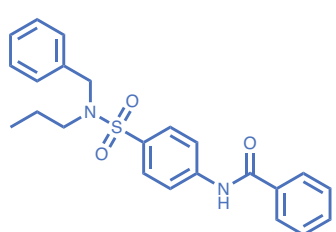
PM2.2



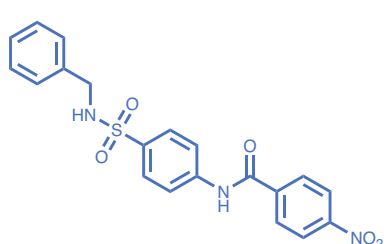
PM2.3



PM2.4



PM2.5



PM2.6

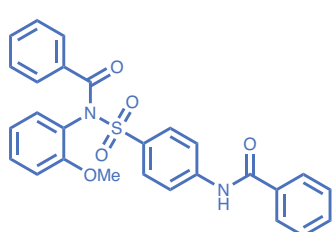


Abbildung 90: Strukturformeln der zweiten Testreihe der Sulfonamid-Derivate

Auf der ersten Testreihe aufbauend, wurden in der zweiten gezielt solche Substanzen untersucht, die strukturell stark **PM1.3** ähneln. Zusätzlich wurde auch die ursprüngliche Leitstruktur **PM0** mit einbezogen, um die Strukturwirkungsbeziehung der Derivate besser beurteilen zu können.

Die Leitstruktur **PM0** weist ein deutlich schlechteres zytotoxisches Profil auf als **PM1.3** und auch die Wirksamkeit auf die Translation kann bei **PM1.3** bereits verbessert werden.

Die weiteren Modifikationen an der Struktur von **PM1.3** zeigen aber alle eine Verschlechterung der zytotoxischen Eigenschaften; so dass mit Ausnahme der Verbindung **PM2.3** alle anderen Verbindungen so toxisch sind, dass eine Abnahme der Translations-effizienz mit hoher Wahrscheinlichkeit den globalen Prozessen im Rahmen des Zelluntergangs geschuldet sind, und nicht einer spezifischen Hemmung der Helikase eIF4A zuzurechnen ist.

Die Verbindung **PM2.3** zeigt nur eine geringe Toxizität, weist aber auch keine klare Reduktion der Translationseffizienz auf. Vielmehr scheint es unter einer geringeren Dosierung (0,5 μ M) sogar zu einer Induktion der Translationseffizienz zu kommen.

Es lässt sich also für diese Testreihe zusammenfassend sagen, dass die weiterführenden Modifikationen von **PM1.3** keinen zusätzlichen Nutzen gebracht haben. Dennoch ermöglichen die Daten ein besseres Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehungen, das in einer weiteren Testreihe angewendet werden kann.

Um die Aussagekraft folgender DLAs zu verbessern, werden bei später durchgeführten Testreihen zunächst die zytotoxischen Eigenschaften genauer bestimmt und dann an diese individuell angepassten Konzentrationen in den DLAs verwendet.

PM0

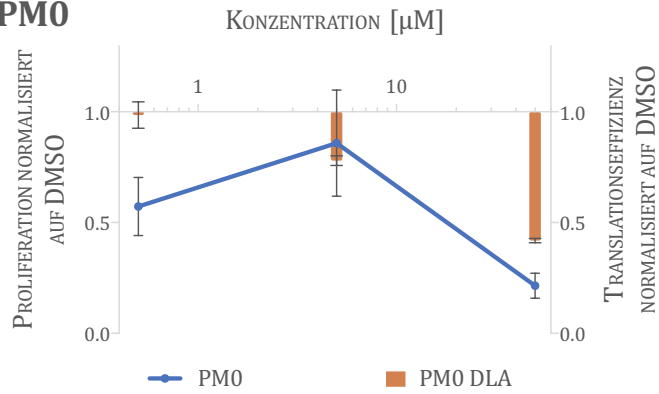
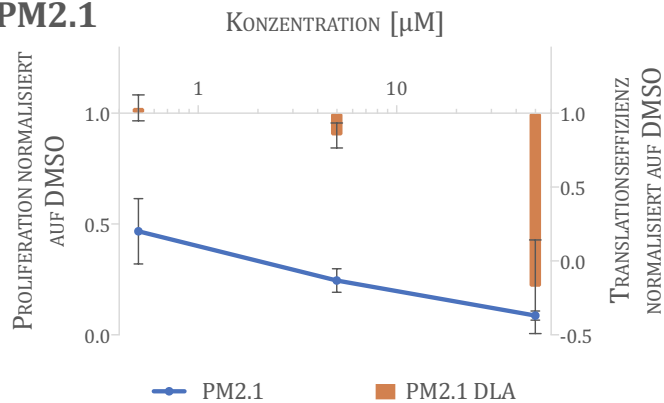
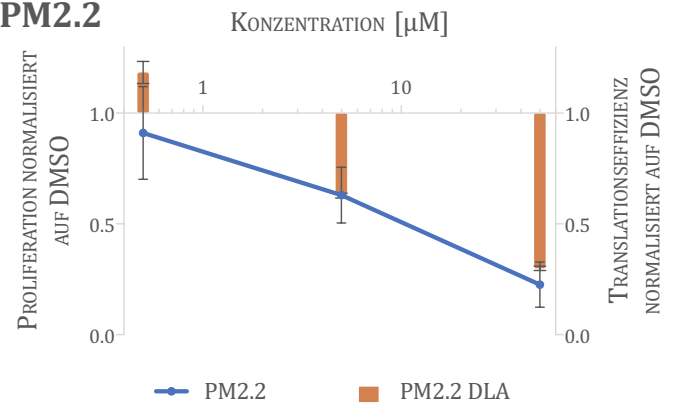


Abbildung 91: Ergebnisse aus der zweiten Testreihe der Sulfonamid-Derivate. WST-1 Assay zur Bestimmung der Zellproliferation nach 24 Stunden Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen (7500 HepG2-Zellen/well; $n = 3$; blaue Graphen, linke Y-Achse). DLA mit der 5'-UTR der VP30 EBOV mRNA zur Untersuchung der Translationseffizienz, nach 24 Stunden Behandlung mit der zu untersuchenden Substanz in Konzentrationen von 5 μM und 50 μM (20000 HepG2-Zellen/well; $n = 3$; orangene Balken, rechte y-Achse).

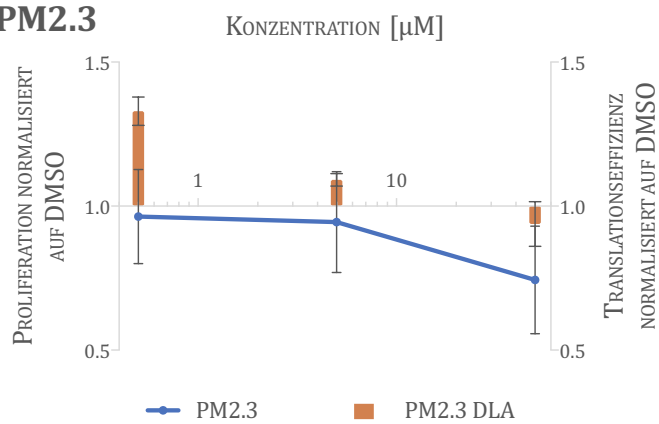
PM2.1



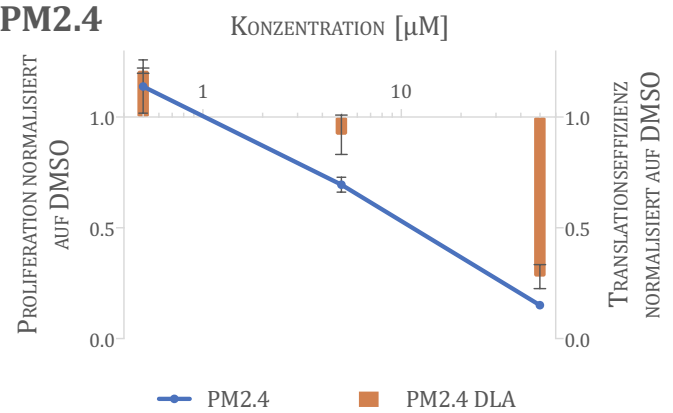
PM2.2



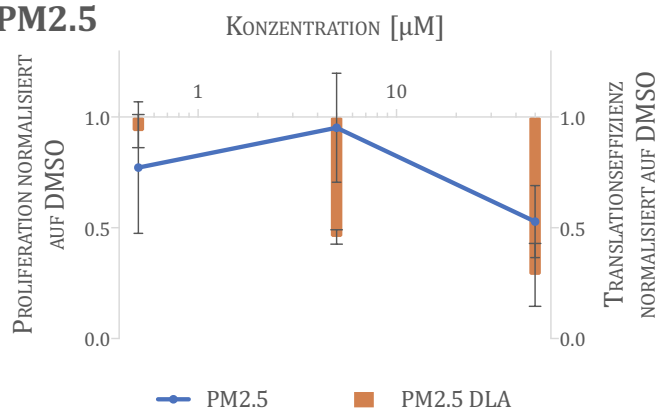
PM2.3



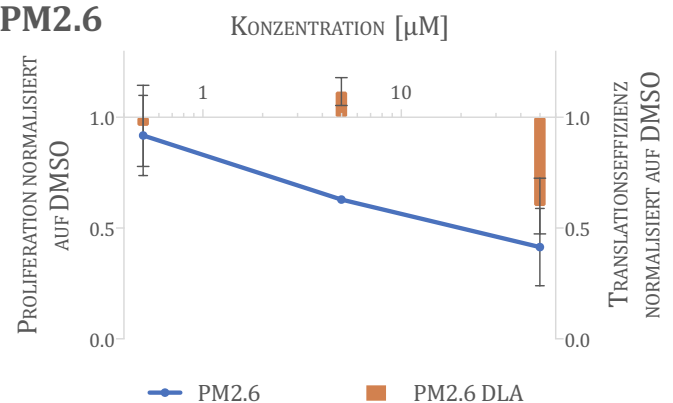
PM2.4



PM2.5



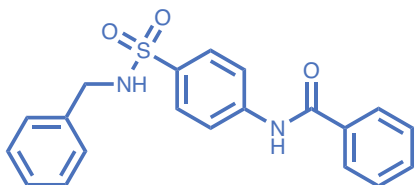
PM2.6



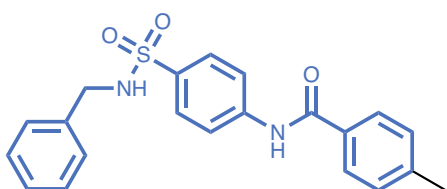
DRITTE TESTREIHE

Im Rahmen einer Masterarbeit, die an die Arbeit von Patrik Menzel anknüpft, entstanden die Substanzen **Schl-38-001**, **Schl-38-002** und **Schl-38-003**, die sich ebenfalls strukturell von der bereits beschriebenen Struktur **PM1.3** ableiten.

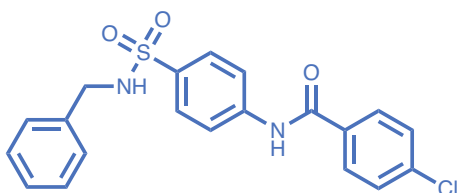
PM1.3



Schl-38-001



Schl-38-002



Schl-38-003

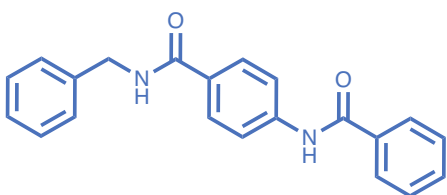


Abbildung 92: Strukturformeln der dritten Testreihe der Sulfonamid-Derivate

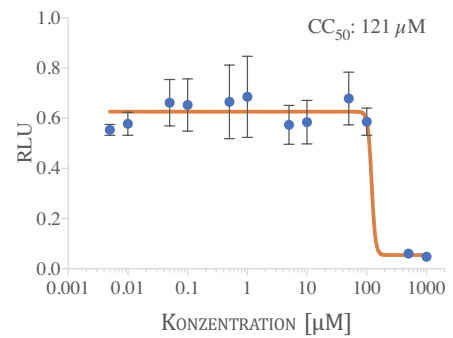
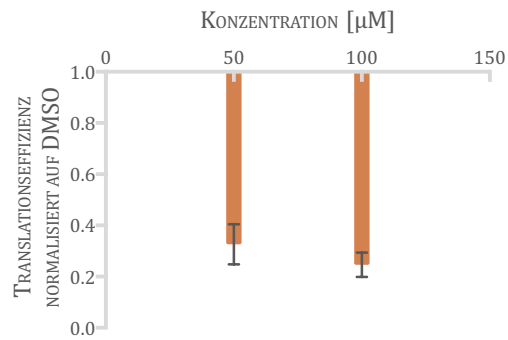
Bei der Untersuchung dieser Substanzen wird die Effektivität der Translation nicht wie bei den zuvor beschriebenen Substanzen am Beispiel der VP30 5'-UTR des Ebola Virus getestet, sondern mit Hilfe eines DLA-Konstrukts, das die 5'-UTR von Pim-1 enthält. Die stärkere Abhängigkeit dieser 5'-UTR von dem Initiationsfaktor eIF4A, soll die Effekte auf die Translationseffektivität besser abbilden.

Bevor die Substanzen in einem DLA auf ihre Wirkung gegenüber der Translation hin untersucht werden, werden deren toxikologischen Eigenschaften charakterisiert. Hierzu wird von allen getesteten Substanzen in einem WST-Assay, die *Zytotoxische Konzentration 50* (CC₅₀) bestimmt. Die Leitsubstanz dieser Testreihe (**PM1.3**), die aus der ersten untersuchten Testreihe stammt, weist mit 121 µM die geringste CC₅₀ auf, ist also am toxischsten. Die anderen Substanzen sind mit 146,3 µM (**Schl-38-002**) und über 180 µM (**Schl-38-001** und **Schl-38-003**) weniger toxisch.

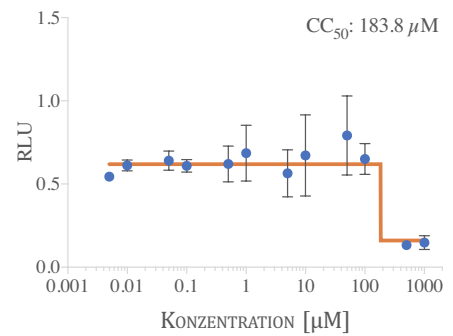
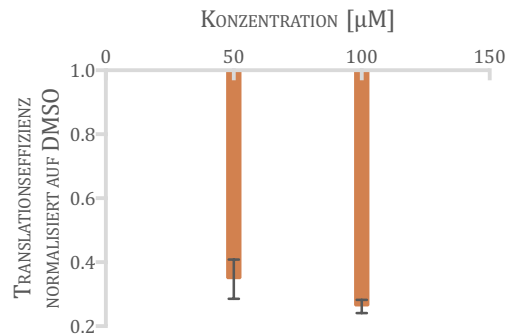
Für die folgenden DLA-Experimente werden daher Konzentrationen von 50 µM und 100 µM gewählt, die entsprechend unterhalb der toxischen Konzentrationen der Substanzen liegen.

Die Methylierung der Leitsubstanz bei **Schl-38-001**, verbessert die toxikologischen Eigenschaften, während ihr inhibitorischer Effekt auf die Translationseffektivität in vergleichbarem Maße erhalten bleibt. Die Modifikationen an den Substanzen **Schl-38-002** und **Schl-38-003** zeigen zwar ebenfalls eine Verbesserung der Toxikologie, jedoch gehen diese mit einer Verschlechterung der inhibitorischen Eigenschaften einher. Kommt es bei **Schl-38-002** lediglich zu einer Abschwächung des Effekts, so ist die Wirksamkeit bei **Schl-38-003** gänzlich aufgehoben.

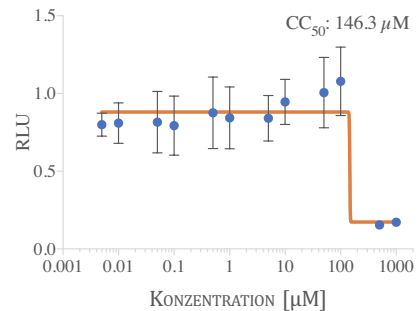
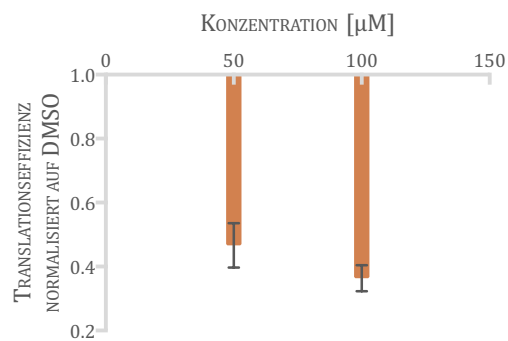
PM1.3



Schl-38-001



Schl-38-002



Schl-38-003

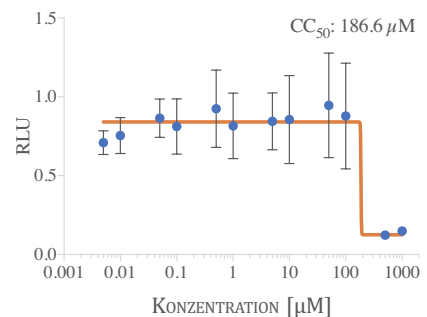
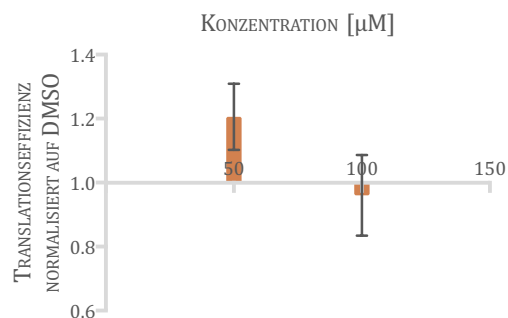
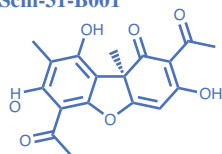
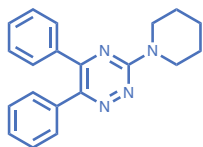


Abbildung 93: Ergebnisse aus der dritten Testreihe der Sulfonamid-Derivate. WST-1 Assay zur Bestimmung der Zellproliferation nach 48 Stunden Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen (7500 HepG2-Zellen/well; n = 4; Diagramm rechts, CC₅₀ berechnet durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Software Prism7). DLA mit 5'-UTR der Pim-1 mRNA zur Untersuchung der Translationseffizienz, nach 48 Stunden Behandlung mit der zu untersuchenden Substanz in Konzentrationen von 50 µM und 100 µM (20000 HepG2-Zellen/well; n = 4; Diagramm links).

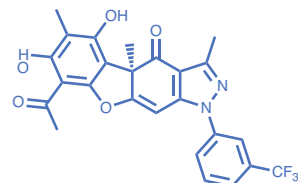
Schl-31-B001



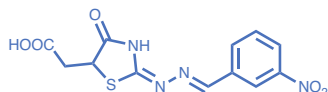
Schl-31-B005



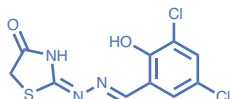
Schl-31-B007



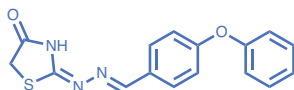
Schl-31-117



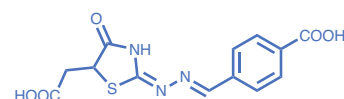
Schl-31-151



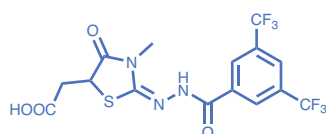
Schl-31-152



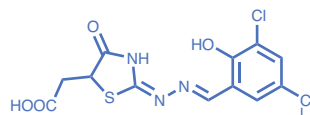
Schl-31-158



Schl-31-162



Schl-31-167



Schl-31-169

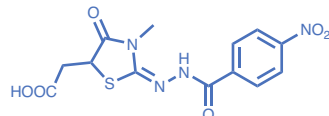


Abbildung 94: Strukturformeln der ersten Testreihe weiterer Silvestrol-Analoga

WEITERE ANSÄTZE FÜR ANALOGA ZU SILVESTROL

ERSTE TESTREIHE

Diese Testreihe entstand parallel zu den ersten zwei Testreihen der Sulfonamid-Derivate, die Assays wurden daher in gleicher Weise wie bei den bereits beschriebenen Reihen durchgeführt. Für die Einschätzung der toxikologischen Eigenschaften dienen hier erneut WST-Assays. Es wurden jeweils drei Konzentrationen untersucht; neben der ersten Messung nach 24 Stunden, wurde eine Messung nach 120 Stunden Inkubation durchgeführt. Für die Bestimmung der Wirkung auf die Helikase eIF4A im DLA, wurde das ursprüngliche Luciferase-Konstrukt mit der 5'-UTR der VP30 Ebola Virus mRNA, eingesetzt, wie bei den ersten beiden Testreihen der Sulfonamid-Derivate.

Die Testreihe umfasst zwei Gruppen von Substanzen, die erste besteht aus den Verbindungen **Schl-31-B001**, **Schl-31-B005** und **Schl-31-B007**, wobei aber keine der drei über eine starke Wirksamkeit auf die Translationseffizienz verfügt.

Innerhalb der zweiten Gruppe von Substanzen verfügt lediglich die Verbindung **Schl-31-152** über einen starken inhibitorischen Effekt auf die Translationseffizienz. Bei einer Konzentration von 50 μM zeigt diese bei einem sehr guten toxikologischen Profil, eine starke Wirksamkeit und hemmt die Translation auf unter 10 % der Effizienz der DMSO Kontrolle. Es ist aber auffallend, dass die Verbindung in Konzentrationen bis 5 μM die Translationseffizienz erhöht. Die Verbindungen **Schl-31-151** und **Schl-31-167** zeigen nach 120 Stunden Inkubation eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung, wohingegen die anderen Substanzen dieser Gruppe, in dieser Hinsicht unauffällig sind.

Für eine erste Charakterisierung der toxikologischen Eigenschaften der Verbindungen erweist sich eine punktuelle Untersuchung von nur drei Konzentrationen an diesen sehr weit auseinanderliegenden Zeitpunkten als wenig aussagekräftig und kommt daher bei den folgenden Screenings nicht mehr zur Anwendung.

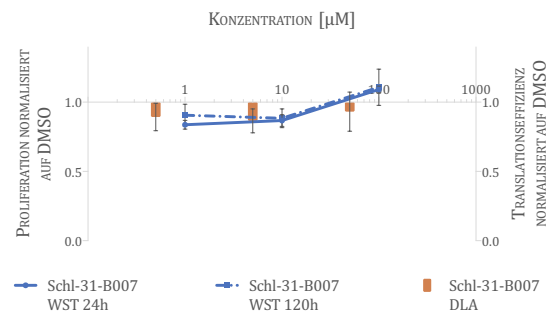
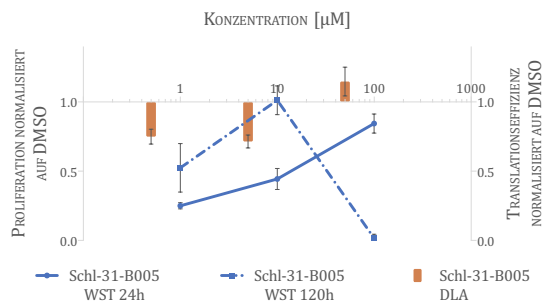
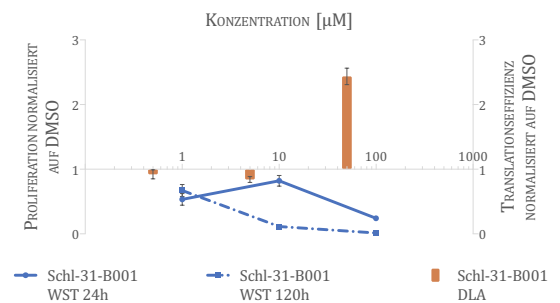
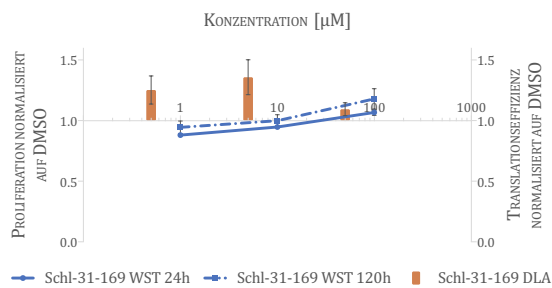
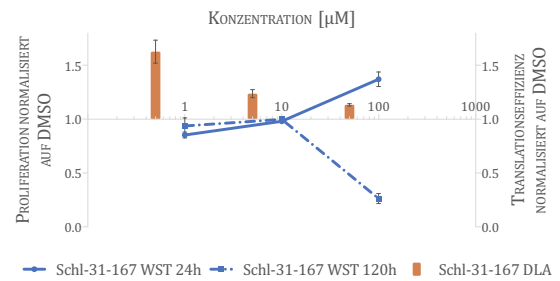
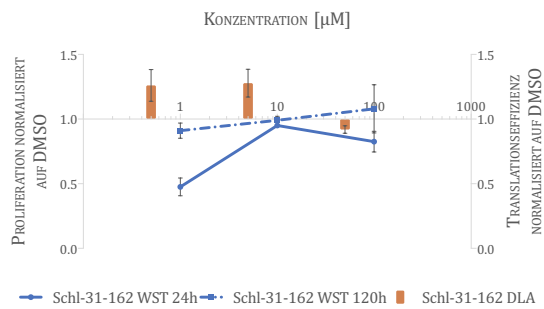
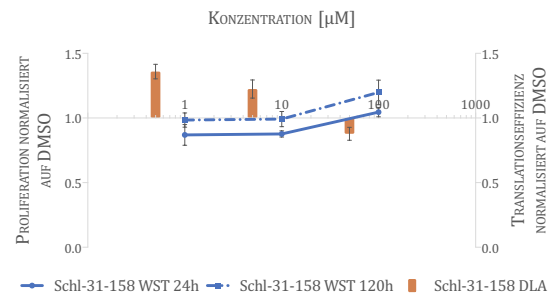
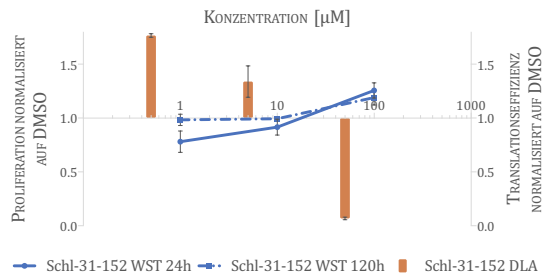
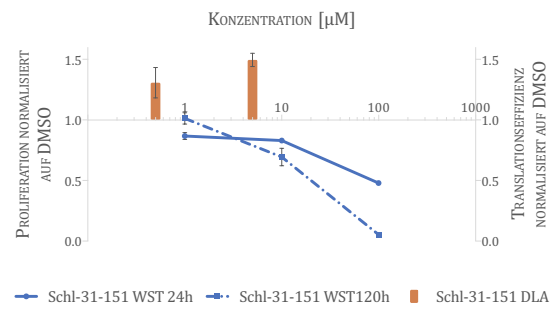
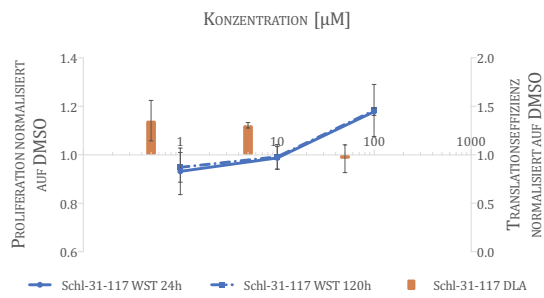


Abbildung 95: Ergebnisse aus der ersten Testreihe weiterer Silvestrol-Analoga. WST-1 Assay zur Bestimmung der Zellproliferation nach 24 Stunden und 120 Stunden Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen (HepG2-Zellen; n = 3; 24 h durchgehende blaue Graphen und 120 h unterbrochene blaue Graphen, linke Y-Achse). DLA mit der 5'-UTR der VP30 EBOV mRNA zur Untersuchung der Translationseffizienz, nach 24 Stunden Behandlung mit der zu untersuchenden Substanz in Konzentrationen von 0,5 μM bis 50 μM (HepG2-Zellen; n = 3; orangene Balken, rechte y-Achse).

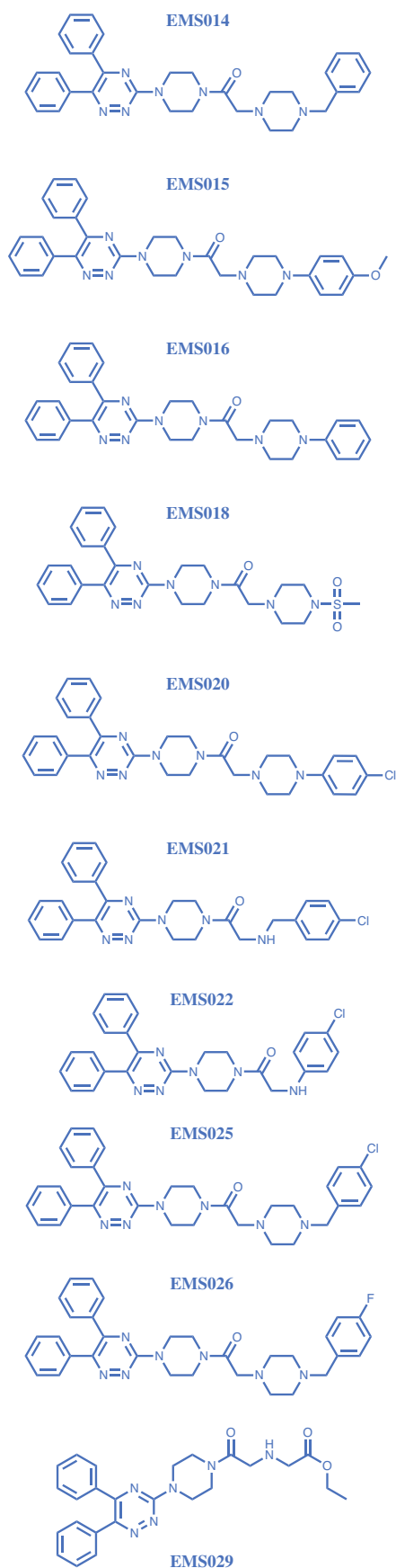


Abbildung 96: Strukturformeln der zweiten Testreihe weiterer Silvestrol-Analoga

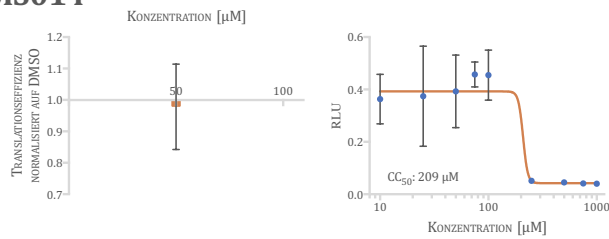
ZWEITE TESTREIHE

Die Substanzen dieser Testreihe leiten sich von der bereits untersuchten Verbindung **Schl-31-B005** ab. Bei dieser Testreihe werden vor der Bestimmung der Wirkung auf die Translationseffizienz, erneut die toxikologischen Eigenschaften genauer charakterisiert. Hierzu werden mit einem WST-Assay die CC_{50} -Werte jeder Verbindung nach 48 Stunden Inkubation bestimmt. Im Anschluss erfolgt ein DLA, mit einem Pim-1 5'-UTR Konstrukt, unter Behandlung der Zellen mit einer Konzentration der Verbindung, die sich im Rahmen der toxikologischen Untersuchung als unbedenklich erwiesen hat. Bei einigen der Verbindungen (**EMS014**, **EMS016**, **EMS018**, **EMS021** und **EMS022**) zeigt sich dennoch, dass der zusätzliche Zellstress durch die notwendige Transfektion der Zellen mit dem Luciferase-Plasmid im Zuge des DLAs, die Zellen soweit abschwächt, dass die untersuchten Konzentrationen toxisch wirken. In diesen Fällen konnten keine Daten erhoben werden.

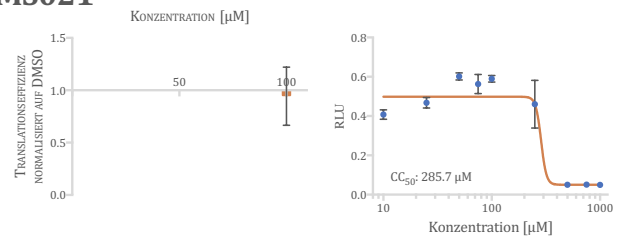
Einen inhibitorischen Effekt auf die Translationseffizienz konnten die Verbindungen **EMS015**, **EMS016**, **EMS020** und **EMS022** zeigen. **EMS015** hemmt die Translationseffizienz bereits bei 50 μ M um etwa 50 %, bei einer CC_{50} von 108,4 μ M. Eine Erhöhung der Konzentration auf 100 μ M kann den Effekt nur minimal verstärken. Einen ähnlichen Effekt auf die Translation zeigen auch die Verbindungen **EMS016** und **EMS022** bei einer Konzentration von 25 μ M, doch die höheren Konzentrationen der beiden Substanzen waren toxisch für die Zellen. Beide weisen mit einer CC_{50} unter 50 μ M ein schlechteres toxikologisches Profil auf als das von **EMS015**. **EMS020** verfügt mit einer Reduktion der Translations-effizienz um 25 % bis 40 % nur über eine geringe Wirkung, verbunden mit einem CC_{50} von etwa 95 μ M.

Trotz der Ausfälle im DLA bei einigen der Substanzen, scheint dieser Versuchsaufbau für ein Screening ein geeignetes Verfahren darzustellen und sollte daher auch für weitere Untersuchungen übernommen werden. Die höheren Konzentrationen sollten aber zukünftig geringer gewählt werden.

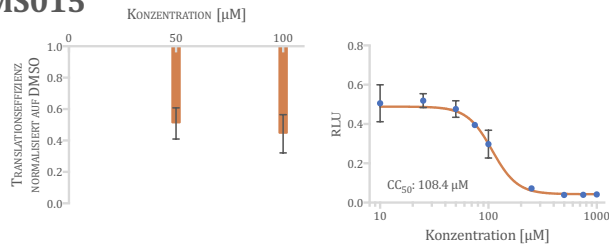
EMS014



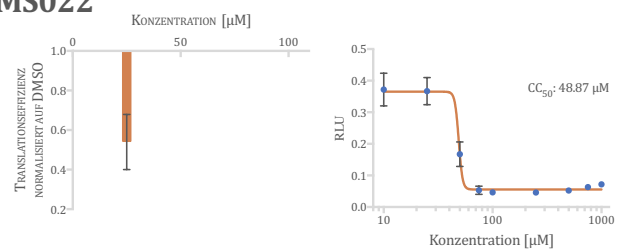
EMS021



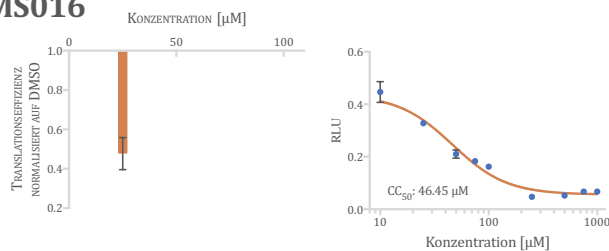
EMS015



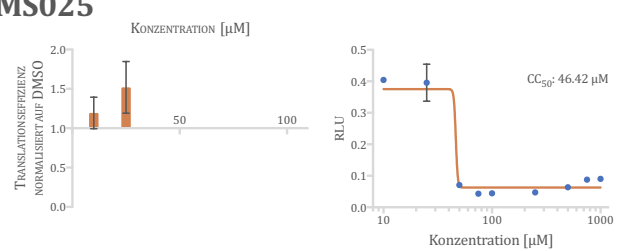
EMS022



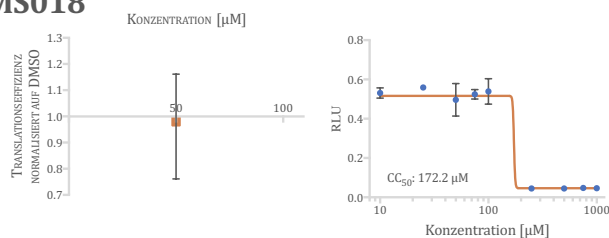
EMS016



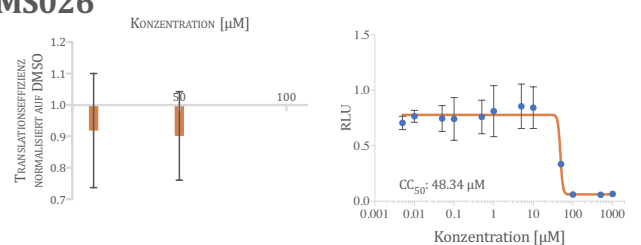
EMS025



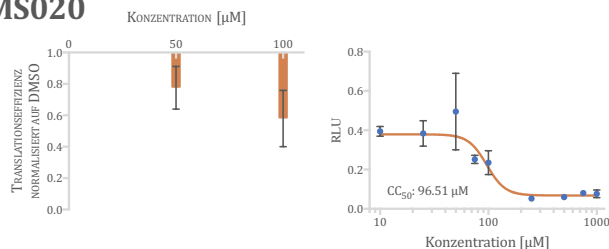
EMS018



EMS026



EMS020



EMS029

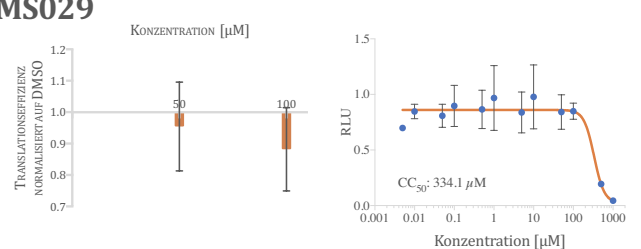
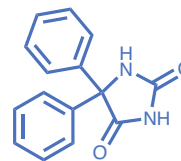
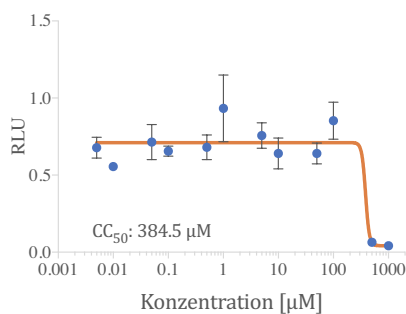
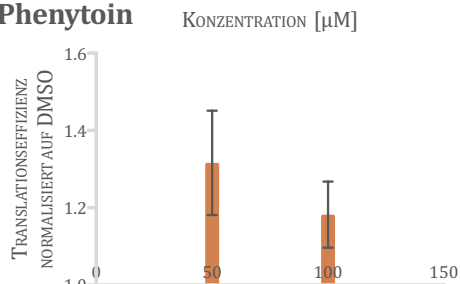
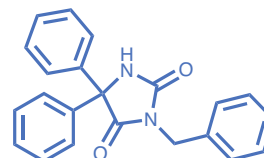
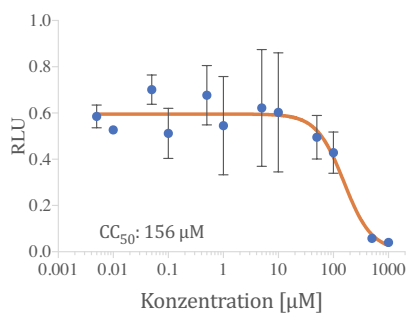
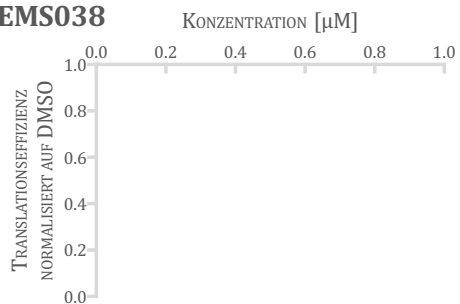


Abbildung 97: Ergebnisse aus der zweiten Testreihe weiterer Silvestrol-Analoga. WST-1 Assay zur Bestimmung der Zellproliferation nach 48 Stunden Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen (HepG2-Zellen; n = 4; Diagramm rechts, CC_{50} berechnet durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Software Prism7). DLA mit 5'-UTR der Pim-1 mRNA zur Untersuchung der Translationseffizienz, nach 48 Stunden Behandlung mit der zu untersuchenden Substanz in Konzentrationen von 50 µM und 100 µM (20000 HepG2-Zellen/well; n = 4; Diagramm links).

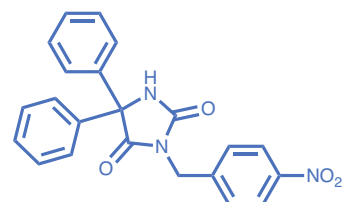
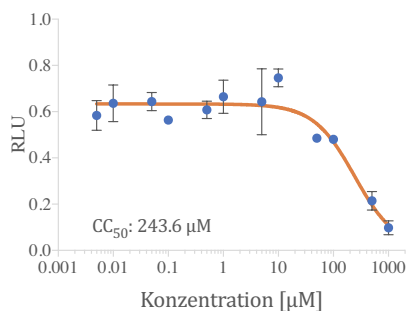
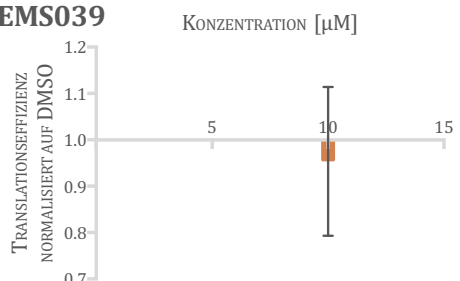
Phenytol



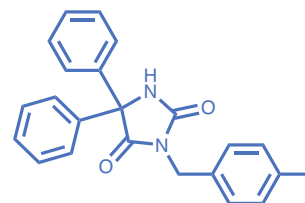
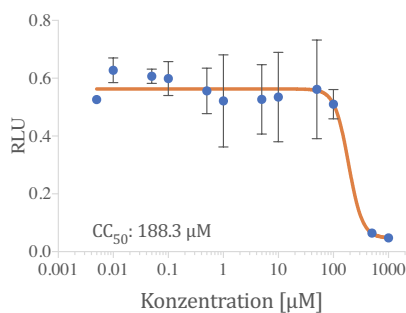
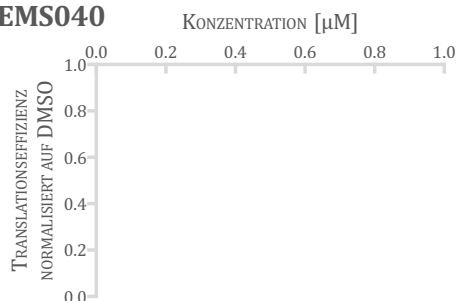
EMS038



EMS039



EMS040



EMS044

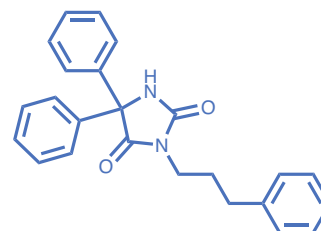
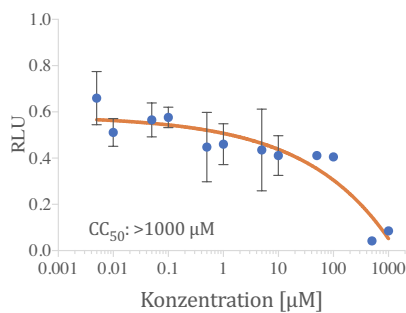
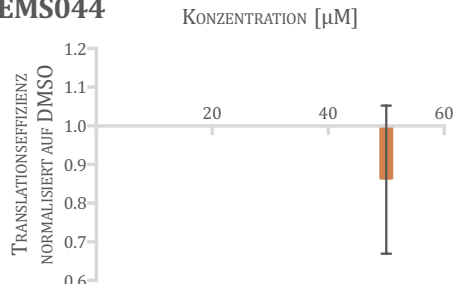


Abbildung 98 Ergebnisse aus der dritten Testreihe weiterer Silvestrol-Analoga und die zugehörigen Strukturformeln. WST-1 Assay zur Bestimmung der Zellproliferation nach 48 Stunden Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen (HepG2-Zellen; n = 4; Diagramm rechts, CC_{50} berechnet durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Software Prism7). DLA mit 5'-UTR der Pim-1 mRNA zur Untersuchung der Translationseffizienz, nach 48 Stunden Behandlung mit der zu untersuchenden Substanz in Konzentrationen von 50 µM und 100 µM (20000 HepG2-Zellen/well; n = 4; Diagramm mitte). Strukturformeln der untersuchten Verbindungen rechts.

DRITTE TESTREIHE

Die dritte Testreihe umfasst Derivate von **Phenytoin**, eines bereits zugelassenen Antiepileptikums und Antiarrhythmikums. Das experimentelle Design dieser Testreihe entspricht noch dem, der vorangegangenen zweiten Testreihe.

Phenytoin zeigt mit einer CC_{50} von etwa 380 μ M gute zytotoxische Eigenschaften, weist aber auf der anderen Seite keinen inhibitorischen Effekt auf. Im Gegenteil, es führt zu einer deutlichen Erhöhung der Translationseffektivität. Auch die strukturell abgeleiteten Derivate **EMS038**, **EMS039**, **EMS040** und **EMS044** verfügen über hohe CC_{50} -Werte; Letztere Verbindung sogar von über 1000 μ M. Um so überraschender ist die Tatsache, dass, ähnlich der vorherigen Testreihe, auch hier unerwartete toxische Effekte im Rahmen des angeschlossenen DLAs auftreten, so dass nur bei den Verbindungen **EMS039** und **EMS044** einzelne Messungen möglich sind. Diese sind auf Grund extremer Schwankungen kaum belastbar, deuten aber auf eine nur mäßige Hemmung der Translation hin.

ERWEITERTER DUAL-LUCIFERSE-ASSAY

Die bisher beschriebenen Untersuchungen können, bezüglich des Einflusses der Substanzen auf die Translation, nur feststellen, ob eine hemmende Wirkung vorliegt oder nicht. Es bleibt offen, ob die Wirkung auf eine Inhibition der Helikase eIF4A zurückgeht, wie man sie bei Silvestrol beobachten kann.

METHODISCHER ANSATZ

Um dieser Fragestellung zu begegnen, wird sich hier einer Kombination von zwei Dual-Luciferase-Assay Konstrukten bedient. Zum einen soll ein Konstrukt mit der 5'-UTR von Pim-1 zeigen, ob die Substanz überhaupt einen Einfluss auf die Translation hat. Das zweite Konstrukt mit der 5'-UTR von β -Globin bildet die Abhängigkeit des beobachteten Effekts von der Helikase eIF4A ab. Wie bereits beschrieben, kann β -Globin unabhängig von eIF4A translatiert werden (vgl. *Silvestrol senkt Pim-1 Translation*).

Sollte eine Substanz keinen Effekt auf die Translation aufweisen, so kann man erwarten, dass bei keinem der beiden Konstrukte eine Wirkung im DLA auftritt. Bei einem Effekt auf die Translation, wird man an Hand der Wirkung auf das Konstrukt mit der 5'-UTR von β -Globin jedoch ablesen können, ob es sich dabei um einen eIF4A-abhängigen Effekt handelt. Zeigt dieses Konstrukt im DLA ebenso wie das Pim-1 Konstrukt eine Reduktion der Translationseffizienz, so ist davon auszugehen, dass die Wirkung der Substanz nicht auf eine spezifische Hemmung von eIF4A zurückzuführen ist. (Abbildung 99)

Um außerdem bestimmen zu können, wie stark die von der Substanz herbeigeführte Inhibition der Translation ist, dient ein eIF4A-Knockdown mit Hilfe einer eIF4A spezifische siRNA als theoretische maximale Inhibition. Als Bezugsgröße dient also die Hemmung der Translation unter Behandlung mit einer spezifischen siRNA gegen eIF4A und der zu untersuchenden Substanz. Dieser Wert wird als 100 %ige Hemmung angenommen. Die Hemmung der Translation bei gleichzeitiger Behandlung mit

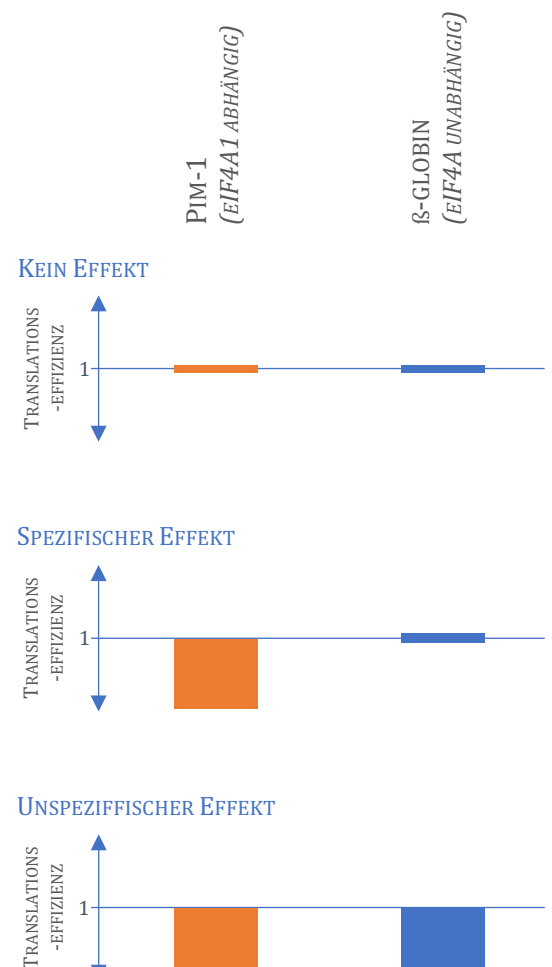


Abbildung 99: Schema zum erweiterten DLA. Mit Hilfe zweier DLA-Konstrukte kann neben dem allgemeinen Effekt einer Substanz auf die Translation, auch die Spezifität für eIF4A untersucht werden. Oben ist das zu erwartende Ergebnis eines DLA gezeigt, wenn die untersuchte Substanz keinerlei Effekt auf die Translation hat. In der Mitte ist ein mögliches Ergebnis gezeigt, wenn die Substanz spezifisch über eine Hemmung von eIF4A die Translation hemmt. Unten wird ein DLA bei einer unspezifischen Hemmung der Translation beschrieben.

QUANTIFIZIERUNG DES EFFEKTS

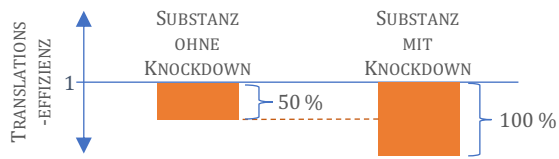


Abbildung 100: Schema zum DLA unter eIF4A-Knockdown. Durch den gezielten Knockdown von eIF4A mittels siRNA kann die erreichte Reduktion der Translation unter Behandlung mit der zu untersuchenden Substanz in ihrer Wirkpotenz beurteilt werden.

einer unspezifischen siRNA-Kontrolle, also ohne eIF4A Knockdown, wird mit dieser Bezugsgröße ins Verhältnis gesetzt und zeigt so das Maß der Hemmung an. (Abbildung 100)

DER NEUE ANSATZ FUNKTIONIERT

In einem ersten Schritt wird überprüft, ob dieses Modell auch praktisch angewendet werden kann. Hierzu wird ein Dual-Luciferase Assay wie oben beschrieben durchgeführt. Silvestrol dient als bekannter selektiver Inhibitor der Helikase eIF4A.

Wie erwartet zeigt sich bei einer Behandlung der HepG2-Zellen mit 10 nM Silvestrol eine selektive Inhibition der Helikase eIF4A (Abbildung 101). Die Translationseffizienz liegt im Falle des Pim-1 Konstruktes bei weniger als 50 % der Translationseffizienz, verglichen mit der DMSO-Kontrolle. Hingegen wird das β -Globin Konstrukt kaum durch die Silvestrol Behandlung beeinflusst. Die Potenz der eIF4A-Inhibition liegt bei etwa 100 %, vergleicht man die Translationseffizienz der Pim-1 Konstrukte durch Silvestrol, bei gleichzeitigem Knockdown von eIF4A1 und ohne Knockdown.

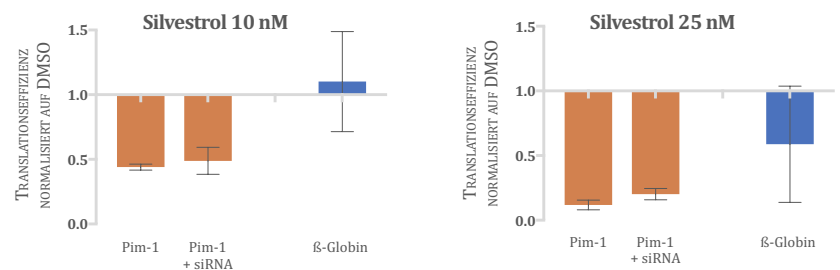


Abbildung 101: Erweiterter DLA mit Silvestrol. HepG2-Zellen wurden mit zwei verschiedenen DLA-Konstrukte, einmal mit der 5'-UTR von Pim-1 (orange) und einmal mit der von β -Globin (blau), und mit siRNA gegen eIF4A1 bzw. einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert. Ein Teil wird mit Silvestrol (10 und 25 nM), ein anderer Teil als Kontrolle mit DMSO (25 nM) behandelt und nach 48 Stunden Inkubation einem DLA unterzogen. Normalisiert auf die DMSO-Kontrolle. n=3

Die Translationseffizienz sinkt bei Behandlung mit einer Silvestrol Konzentration von 25 nM noch einmal deutlich; aber man kann klar erkennen, dass dabei die Translation global gehemmt wird. Auch das β -Globin Konstrukt weist eine Hemmung der Translationseffizienz auf. Dies lässt sich mit dem Erreichen einer zytotoxischen Konzentration erklären. Der CC_{50} von Silvestrol liegt in HepG2-

Zellen bei 19,22 nM (vgl. *Toxizität in Krebszelllinien*). Die Selektivität von Silvestrol auf die eIF4A abhängige Translation geht damit verloren. Es bleibt außerdem zu prüfen, ob die hohe Standardabweichung bei den Daten des β -Globin-Konstrukts, auf eine schlechtere Transfektionseffizienz des verwendeten Plasmids zurückzuführen ist.

SUBSTANZEN ZEIGEN KEINE EIF4A-ABHÄNGIGKEIT

Es konnte gezeigt werden, dass es mit den beschriebenen Anpassungen des DLAs möglich ist, eine Aussage über die Abhängigkeit von eIF4A bei der Hemmung der Translationseffizienz zu treffen. Daher wurde eine breite Auswahl der bereits getesteten Substanzen diesem Assay unterzogen, um so die Spezifität auf eIF4A in deren Wirkung zu untersuchen (Abbildung 102).

Dabei ist aufgefallen, dass nur wenige Substanzen (**EMS026**, **EMS029**, **Phenytain** und **Schl-38-003**) überhaupt eine eIF4A-Abhängigkeit aufweisen. Diese induzieren aber scheinbar eher eine erhöhte Translationseffizienz, als dass sie diese, wie gesucht, senken.

Alle weiteren untersuchten Substanzen, die zwar zu einer mitunter starken Reduktion der Translationseffizienz führen (**EMS015**, **EMS016**, **Schl-31-152**, **PM1.2**, **Schl-38-001** und **Schl-38-002**), tun dies jedoch global, also auch bei solchen, die eIF4A unabhängig translatiert werden. Dies ist durch die verminderte Expression der Firefly-Luciferase vermittelt durch die β -Globin 5'-UTR nachweisbar.

Es wird somit deutlich, dass die bisher synthetisierten und untersuchten Substanzen, trotz der teils vorhandenen Wirkung auf die Translationseffizienz, nicht das gewünschte Ziel angreifen, nämlich eIF4A. Aber mit diesem Assay sollte in Zukunft eine fundierte Sondierung von Leitsubstanzen und deren zielgerichtete Weiterentwicklung möglich sein.

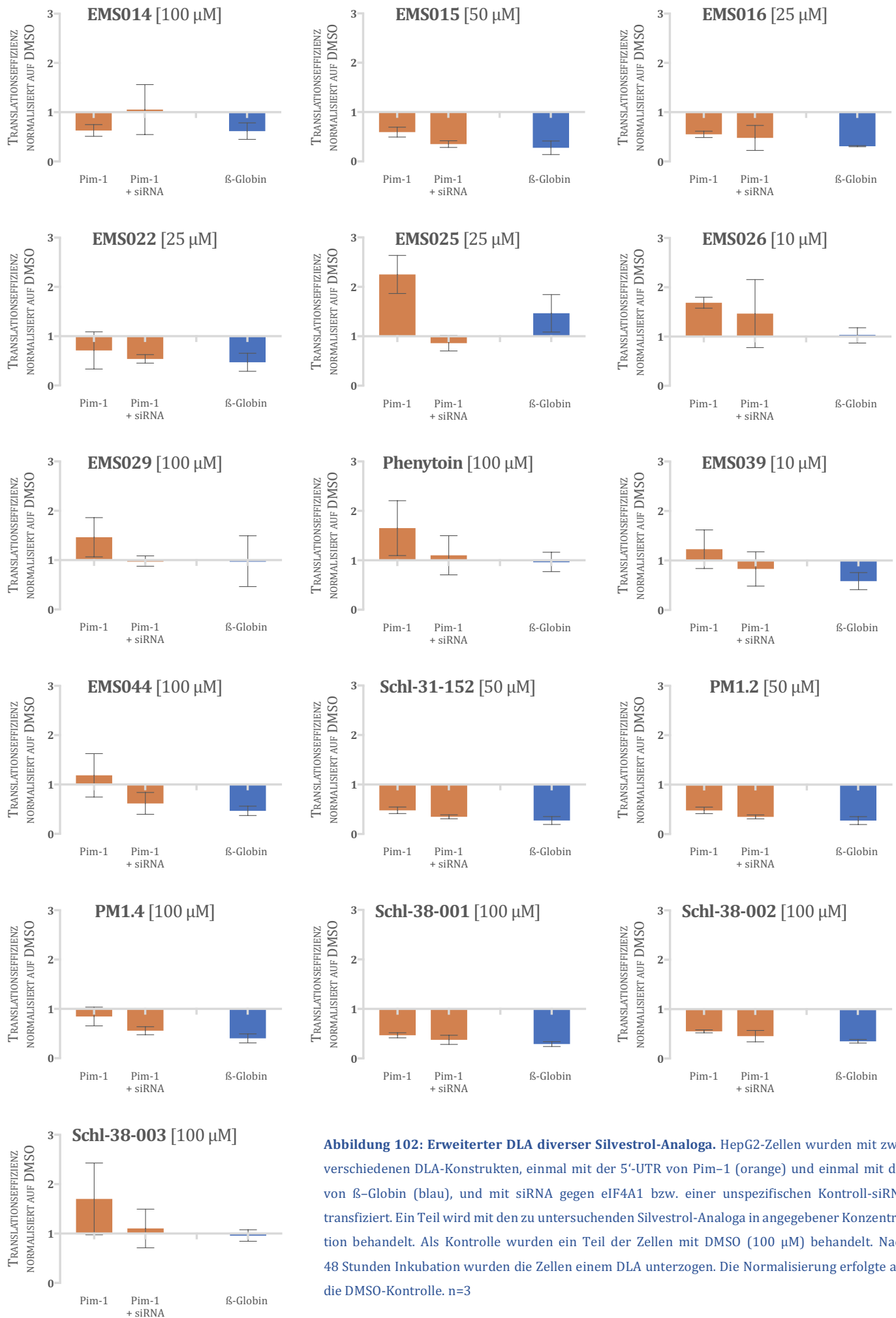


Abbildung 102: Erweiterter DLA diverser Silvestrol-Analoga. HepG2-Zellen wurden mit zwei verschiedenen DLA-Konstrukten, einmal mit der 5'-UTR von Pim-1 (orange) und einmal mit der von β-Globin (blau), und mit siRNA gegen eIF4A1 bzw. einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert. Ein Teil wird mit den zu untersuchenden Silvestrol-Analoga in angegebener Konzentration behandelt. Als Kontrolle wurden ein Teil der Zellen mit DMSO (100 µM) behandelt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen einem DLA unterzogen. Die Normalisierung erfolgte auf die DMSO-Kontrolle. n=3

HELIKASE-ASSAY

Um die Testung neuer Substanzen, bezüglich ihrer Wirkung auf die Helikase eIF4A zu vereinfachen, soll ein Helikase-Assay *in vitro* konzipiert und etabliert werden. Dieser soll gleichzeitig schnellere Ergebnisse liefern können, da bei einem solchen *in vitro* Test keine mehrtägigen Inkubationen abgewartet werden müssen.

HELIKASE-ASSAY

Um sich der Fragestellung zu nähern, wurde sich an bereits publizierten Helikase-Assays für eIF4A orientiert. (Cencic et al., 2012; Rogers et al., 1999) Neben der eigentlichen Helikase eIF4A werden die Faktoren eIF4B und eIF4G eingesetzt, um die Aktivität der Helikase, ähnlich wie unter nativen Bedingungen, zu optimieren.

(vgl. *Eukaryotischer Translations Initiationfaktor 4 A* (eIF4A))

PRINZIP

Als RNA-Struktur wird die 5'-UTR von VP35 des Ebola Virus genutzt, um einen Bezug zu dem von uns bereits breit untersuchten Ebola-Feld herzustellen. (Abbildung 103).

Eine P³²-markierte Sonde, die komplementär zu einer nativ nicht zugänglichen Basensequenz innerhalb des ersten Hairpins ist, soll bei einer vorhandenen Helikase-Aktivität von eIF4A an die RNA binden und so durch einen Shift im Gel, diese Aktivität anzeigen.

Es stellen sich dabei zwei Herausforderungen: I.) Die Sonde soll ohne Helikase-Aktivität nicht in den Hairpin invadieren. II.) Die einmal gebundene Sonde soll durch die Helikase unter den multiple-turn-over Bedingungen nicht wieder von der RNA abgespalten werden können. Diese Anforderungen an den Aufbau des Assays verhalten sich auf den ersten Blick konträr zueinander, da durch eine verstärkte Affinität der Sonde zur RNA, gleichzeitig die Neigung zum Invadieren in den Hairpin steigt. Der Einsatz von modifizierten Basen wie LNAs, um ein Aufschmelzen eines einmal gebildeten Duplex aus RNA und Sonde zu verhindern, fällt damit

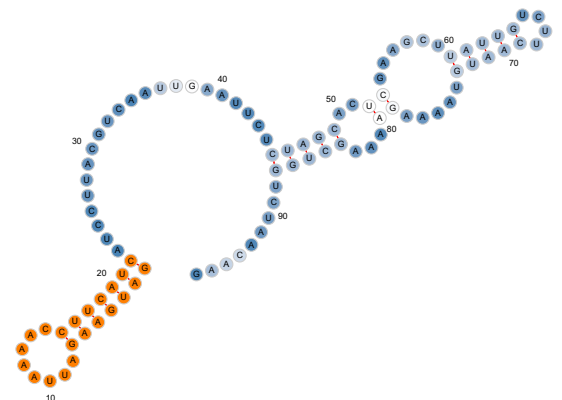


Abbildung 103: Vorhersagen der Sekundärstruktur der EBOV 5'-UTR von VP35. Orange hervorgehoben sind die 5' terminalen Hairpin-Strukturen. MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver ([http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi](http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi))

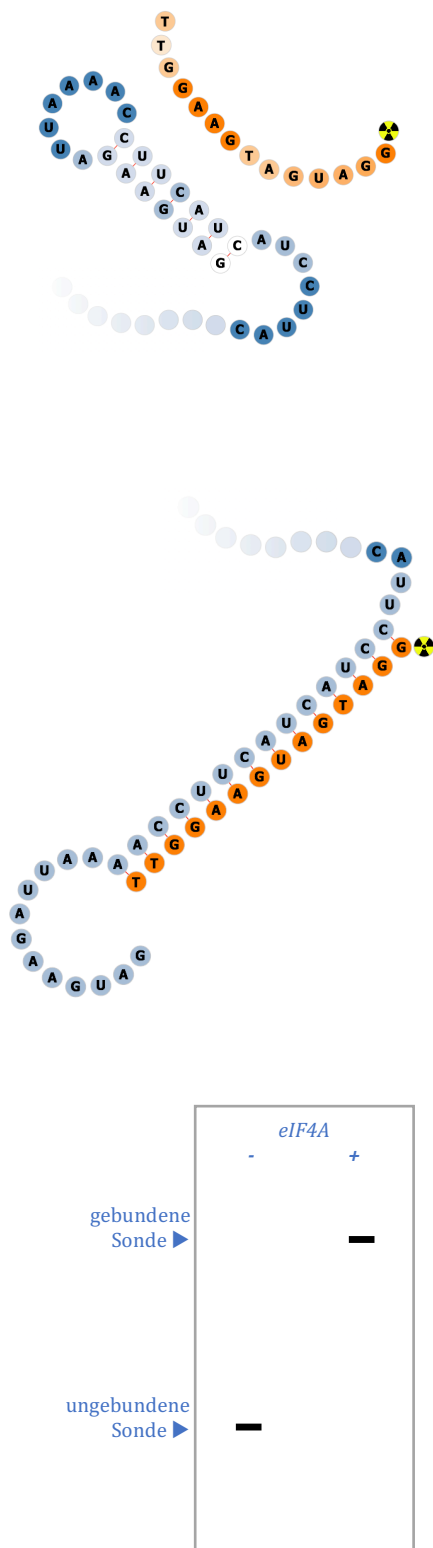


Abbildung 104: Schema zum Helikase Assay. Oben: Hairpin-Struktur der VP35 5'-UTR des Ebola Virus zusammen mit der nicht gebundenen komplementären 5' markierten Sonde (orange). Mitte: Die an die 5'-UTR gebundene Sonde, nach vorheriger Entwindung der Sekundärstruktur durch eIF4A. Unten: Erwartetes Gelbild nach Shift der Sonde durch Bindung an die 5'-UTR.

von vorn herein aus. Ist die Bindung jedoch zu schwach, so ist es sehr wahrscheinlich, dass sich der ursprüngliche Hairpin wieder ausbildet.

Einen wichtigen Hinweis liefert hierbei eine Publikation, nach der ein RNA/DNA-Duplex deutlich schlechter von eIF4A entwunden werden kann, als ein reiner RNA/RNA-Duplex (Rogers, Lima, & Merrick, 2001).

Dem Protokoll aus den erwähnten Publikationen folgend, in Kombination mit der Verwendung einer P^{32} -markierten DNA-Sonde, soll sich der Assay wie folgt darstellen: I.) Die 5'-UTR von VP35 dient als RNA-Templat, mit einem 5'-terminalen Hairpin als Sekundärstruktur. Die markierte Sonde kann nicht an die 5'-UTR binden, da der ausgebildete Hairpin, die komplementäre Sequenz blockiert. II.) In Gegenwart der Helikase eIF4A und der anderen beteiligten Initiationsfaktoren, kommt es zur Destabilisierung der Sekundärstruktur und die Zielsequenz der Sonde wird zugänglich. III.) Da der so gebildete RNA/DNA-Duplex von eIF4A nicht entwunden werden kann, bleibt die Bindung an das RNA-Templat stabil und man kann bei gebundener Sonde einen Shift der Sonde auf einem nativen PAA-Gel detektieren. (Abbildung 104)

ETABLIERUNG DES HELIKASE-ASSAYS

Im Folgenden soll es darum gehen, den hier erdachten Assay, auf seine praktische Umsetzbarkeit hin zu untersuchen. Daher werden auch Gele zurate gezogen, die nur über eine geringe Qualität und Aussagekraft verfügen, aber trotzdem Hinweise liefern können, wie weitere Anpassungen im Design des Assays aussehen könnten.

ERSTER VERSUCH

In einem ersten Versuch werden als Startpunkt die Bedingungen aus den bereits erwähnten Publikationen übernommen und versucht, den Effekt von Silvestrol auf die Helikase-Aktivität von eIF4A abzubilden.

Das Gelbild zeigt nur einen geringen Anteil gebundener Sonde und dies auch nahezu in gleichem Maße über alle Banden hinweg. Es gibt nach einer Auswertung des Gels nur minimale Unterschiede zwischen der Positiv- und Negativkontrolle. Bei der Positivkontrolle wurde der Ansatz ohne die Enzyme kurzzeitig thermisch denaturiert, es sollte also der Großteil der markierten Sonde an das RNA-Templat gebunden sein und somit durch die Vergrößerung auf dem Gel weiter nach oben verlagert sein. Bei der Negativkontrolle sind weder Enzym vorhanden, noch wurde der Ansatz thermisch denaturiert. Die Sonde sollte also nicht binden und auf dem Gel weiter unten laufen. Die vier rechten Banden zeigen die Ansätze mit Enzym und Silvestrol als Inhibitor von eIF4A in steigender Konzentration. Es zeigen sich auch hier keine signifikanten Unterschiede im Bindungsverhalten der Sonde an das RNA-Templat.

Es ist davon auszugehen, dass die Affinität der Sonde an das RNA-Templat nicht ausreichend groß ist, um dauerhaft an diese zu binden. Die verwendete Sonde hat eine Länge von 14 Basen und ist damit vermutlich zu kurz für eine stabile Bindung, im Weiteren wurde daher eine Sonde mit 19 Basen Länge verwendet.

LÄNGERE SONDE

Bei diesem Experiment ersetzt die 19 Basen lange Sonde die kürzere 14 Basen lange Sonde aus dem vorherigen Experiment: jedoch zeigt auch diese keine Verbesserung im Bindungsverhalten.

Hier ist zwar ein geringfügig deutlicherer Unterschied zwischen der Positiv- und der Negativkontrolle zu erkennen, ungeachtet dessen ist der Anteil gebundener zu ungebundener Sonde mit etwa 10 % zu gering, um eine aussagekräftige Auswertung zuzulassen.

Bei den rechten Banden, die den Silvestrol-Gradienten abbilden, wird deutlich, dass die Bindung der Sonde an das RNA-Templat ohne eine Beteiligung der Helikase eIF4A zustande kommt.

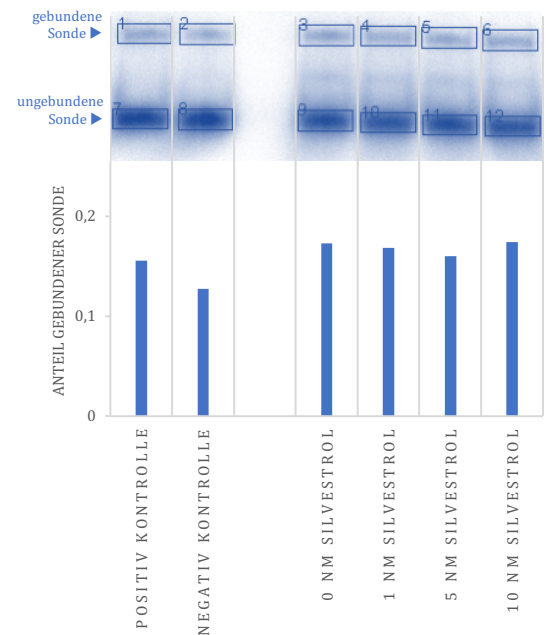


Abbildung 105: Erster Versuch Helikase-Shift-Assay. Natives PAA-Gel eines Helikase-Shift-Assays mit Auswertung der Bandenintensität mit Hilfe der Software Aida.

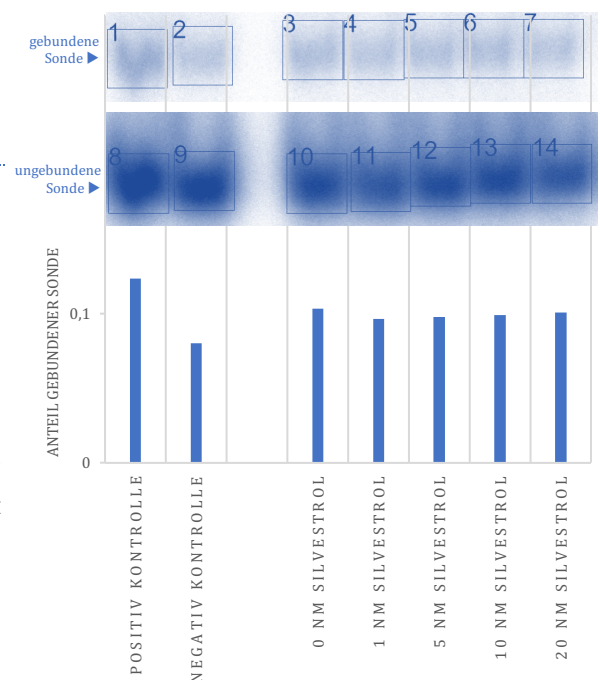


Abbildung 106: Helikase-Shift-Assay mit längerer Sonde. Natives PAA-Gel eines Helikase-Shift-Assays mit Auswertung der Bandenintensität mit Hilfe der Software Aida.

Da die längere Sonde ein geringfügig besseres Verhältnis zwischen den Kontrollen zeigt, werden die weiteren Optimierungsversuche mit dieser durchgeführt.

HÖHERE TEMPLAT-KONZENTRATION

Um ausschließen zu können, dass die eingesetzte Konzentration an RNA-Templat den Anteil gebundener Sonde limitiert, wird in diesem Experiment die fünffache Konzentration des RNA-Templats eingesetzt, verglichen mit den vorangegangenen Versuchen.

Der Anteil gebundener zu ungebundener Sonde hat sich hierdurch mit etwa 30 bis 40 % deutlich erhöht, dennoch liegt selbst bei der Positivkontrolle noch der größte Teil der Sonde ungebunden vor. Da diese geringe Bindung an das RNA-Templat sowohl bei den Ansätzen mit den Faktoren eIF4A, eIF4G und eIF4B auftritt als auch bei den Kontrollen ohne deren Zusatz, werden nun weitere Optimierungsversuche zunächst ohne Enzym durchgeführt.

HÖHERE KONZENTRATION DER SONDE

Als nächstes werden verschiedene Konzentrationen der Sonde eingesetzt, um den Anteil gebundener Sonde weiter zu erhöhen. Es werden den 8.000 cpm/Ansatz radioaktiv-markierter Sonde hierfür steigende Konzentrationen nicht markierter Sonde zugesetzt. Diese reichen von 50 nM bis 1 μ M. Da es bei diesem Experiment nur um die Ermittlung der optimalen Sonden-Konzentration gehen soll, werden keine Enzyme eingesetzt. Um die maximale Bindungskapazität bestimmen zu können, wird für jede Konzentration das RNA-Templat bei 95 °C thermisch denaturiert und die Zielsequenz der Sonde so zugänglich gemacht; dies entspricht der vorherigen Positivkontrolle. Neben diesen Ansätzen werden, entsprechend der vorherigen Negativkontrolle, die gleichen Konzentrationen wie im regulären Assay bei 37 °C inkubiert. In Abwesenheit der Helikase sollte die Sonde somit nicht binden.

Bei diesem Experiment wird deutlich, dass mit steigender Sonden-Konzentration auch der Anteil der gebundenen Sonde steigt. So kann bei der höheren Konzentration von 1 μ M eine vollständige

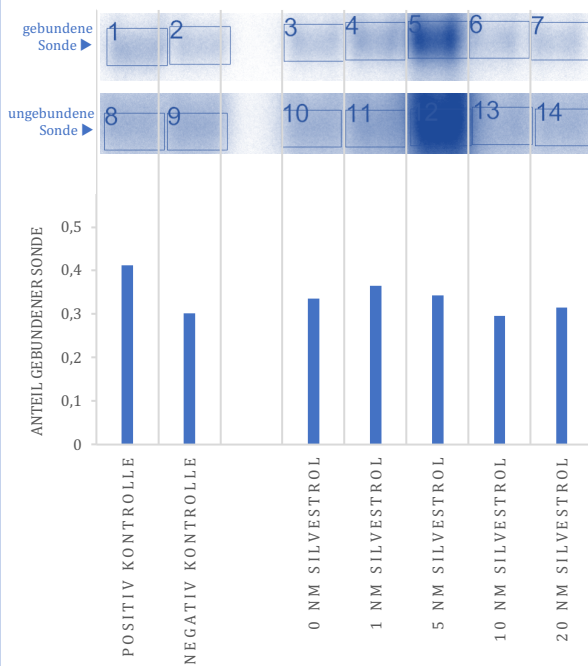


Abbildung 107: Helikase-Shift-Assay mit höherer Templat-Konzentration. Natives PAA-Gel eines Helikase-Shift-Assays mit Auswertung der Bandenintensität mit Hilfe der Software Aida.

Bindung an das Templat und bei 0,5 μM eine nahezu vollständige Bindung beobachtet werden. Ein ähnliches Bild zeigt sich aber auch bei den Ansätzen, die nicht denaturiert wurden. Die Sonde scheint also zumindest teilweise in den Hairpin zu invadieren. In den niedrigeren Konzentrationen ist die Tendenz der Sonde zum Invadieren zwar geringer, aber auch unter den denaturierenden Bedingungen wird nur ein geringer Anteil der Sonde an das Templat gebunden.

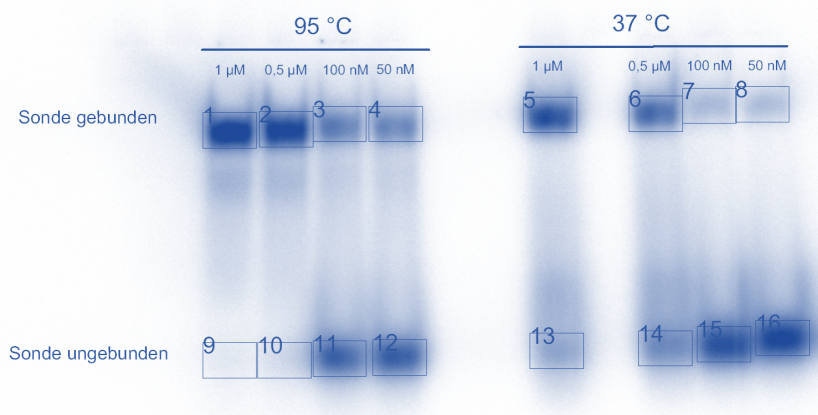


Abbildung 109: Helikase-Shift-Assay mit variierender Sonden-Konzentration. Natives PAA-Gel eines Helikase-Shift-Assays mit Auswertung der Bandenintensität mit Hilfe der Software Aida.

Die Affinität der Sonde zur RNA scheint also zu gering zu sein, damit diese die zugängliche Zielsequenz langfristig binden kann. Andererseits zeigt die Tendenz der Sonde, in die Hairpin-Struktur zu invadieren, dass die Affinität der Sonde auch nicht deutlich weiter erhöht werden kann.

INKUBATIONSDAUER

Nachdem unterschiedliche Konzentrationen an Sonden-DNA und Templat-RNA ausgetestet wurden, werden nun in diesem Versuch unterschiedliche Inkubationszeiten für die Enzyme getestet.

Unter den weiter optimierten Bedingungen weisen die Ansätze mit der Helikase einen deutlich geringeren Anteil gebundener Sonde auf als die Negativkontrolle ohne Enzym unter ansonsten gleichen Bedingungen (15 Minuten Inkubation). Bei zunehmender Inkubationszeit ist zudem eine Tendenz hin zu weniger gebundener Sonde

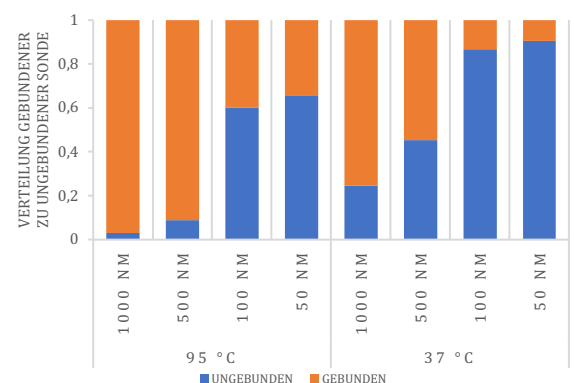


Abbildung 108: Auswertung des Gelbildes aus Abbildung 109. In orange der Anteil gebundener Sonde zu ungebundener Sonde in blau.

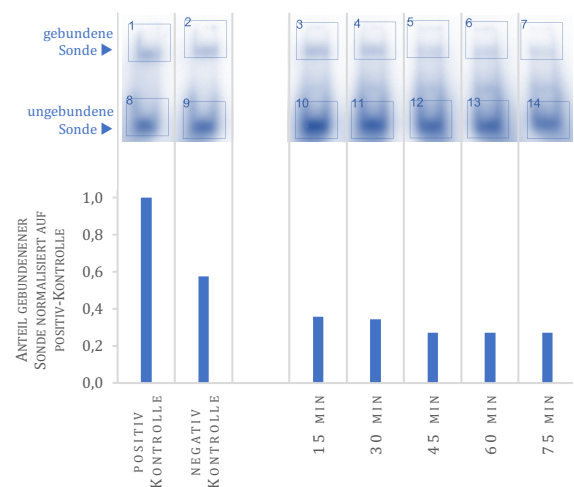


Abbildung 110: Helikase-Shift-Assay mit variierender Inkubationszeit. Natives PAA-Gel eines Helikase-Shift-Assays mit Auswertung der Bandenintensität mit Hilfe der Software Aida.

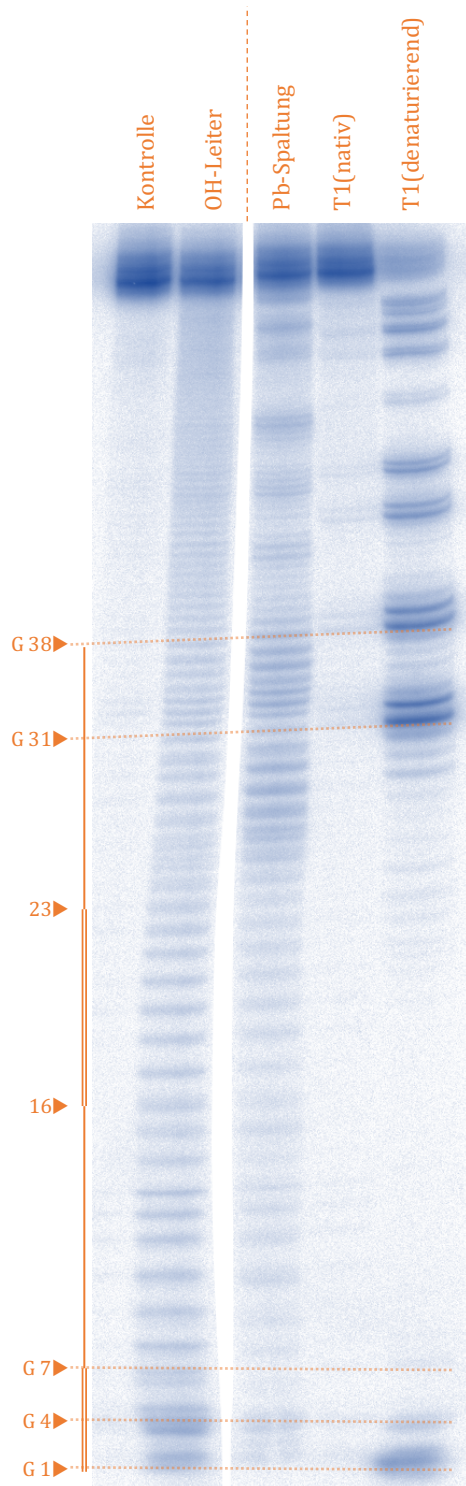


Abbildung 111: Probinggel des RNA-Templats. 15 % denaturierendes PAA-Gel. Von links nach rechts: Kontrolle, unbehandelte RNA; OH-Leiter; Pb-Spaltung; T1-Verdau unter nativen Bedingungen; T1-Verdau unter denaturierenden Bedingungen. Neben dem Bild links in orange die doppelsträngig und einzelsträngig vorhergesagten Bereiche am 5'-terminalen Ende der RNA.

zu erkennen. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein entstandener RNA/DNA-Duplex – vermutlich zuvor in den Hairpin invadierte Sonden-DNA – von der Helikase aufgeschmolzen wird und die ursprüngliche Sekundärstruktur in Form des Hairpins wieder eingenommen wird. Die Inkubationszeit und die Affinität der Sonde zum Template könnten also verringert werden um so ein vorzeitiges Invadieren zu vermeiden.

PROBING DER VP35 5'-UTR

Um die vorhergesagte Sekundärstruktur der Templat-RNA, also der 5'-UTR von VP35, zu validieren, wurde ein Probing durchgeführt. Hauptaugenmerk wurde dabei auf den vorhergesagten 5'-terminalen Hairpin gelegt.

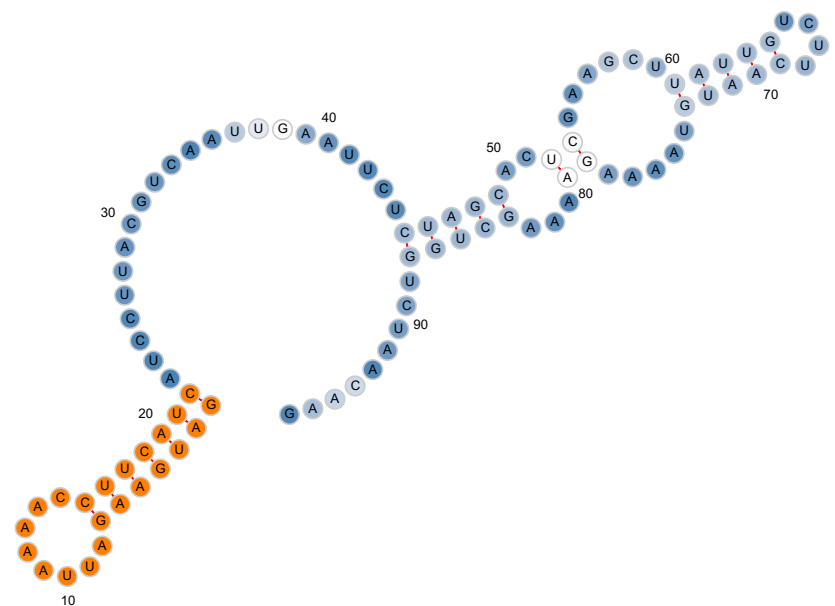


Abbildung 112: Vorhersagen der Sekundärstruktur der EBOV 5'-UTR von VP35.

Orange hervorgehoben sind die 5' terminalen hairpin Strukturen. MFE Struktur berechnet mit RNAfold Webserver ([http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi bin/ RNAWebSuite/RNAfold.cgi](http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi))

Im Gelbild (Abbildung 111: Probinggel des RNA-Templats. 15 % denaturierendes PAA-Gel. Von links nach rechts: Kontrolle, unbehandelte RNA; OH-Leiter; Pb-Spaltung; T1-Verdau unter nativen Bedingungen; T1-Verdau unter denaturierenden Bedingungen. Neben dem Bild links in orange die doppelsträngig und einzelsträngig vorhergesagten Bereiche am 5'-terminalen Ende der

RNA.Abbildung 111) sind die Bereiche markiert, die laut der bioinformatischen Vorhersage doppel- bzw. einzelsträngig sind. Das Bandenmuster der Bleispaltung ist aber gerade im Bereich der ersten etwa 25 Nukleotide nicht eindeutig. Blei spaltet einzelsträngige RNA. So würde man bei den Nukleotiden 8 bis 15 ein deutliches Spaltungsmuster erwarten, und in den Bereichen der Nukleotide 1 bis 7 und 16 bis 22 keine Spaltprodukte. Die Banden ab dem Nukleotid 23 werden etwas stärker, wie man es auch erwarten würde (vgl. Abbildung 112), da hier der vorhergesagte Hairpin endet und ein ausgedehnter einzelsträngiger Bereich folgen soll. Alles in allem bleibt die Bleispaltung aber sehr schwach und kann nur einen Hinweis auf die wirkliche Struktur geben.

Die RNase T1 schneidet spezifisch einzelsträngige RNAs an Guanin-Basen. Das Fehlen von Spaltprodukten auf Höhe der Nukleotide 1, 3 und 7 unter nativen Bedingungen deutet jedoch auch auf den vorhergesagten doppelsträngigen Bereich am 5'-terminalen Ende hin.

Auch wenn die Auswertung des Probings nur Hinweise liefern kann, so deuten die gewonnenen Daten doch darauf hin, dass die vorhergesagte Struktur tatsächlich vorliegt.

ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK

ZUSAMMENFASSUNG

STATINE IM ONKOGENEN KONTEXT

WIRKUNG VON SIMVASTATIN AUF PIM-1 SPIEGEL

Es konnte insbesondere in HepG2 Zellen gezeigt werden, dass die Behandlung mit Simvastatin zu einer Senkung der Konzentration des Proto-Onkogens Pim-1 führt. Ein möglicher Mechanismus für diesen Effekt, der eine Kompensationsreaktion auf den inhibierten Mevalonatweg beschreibt, wurde vorgestellt; und dessen Plausibilität für die Leberzelllinie HepG2 experimentell aufgezeigt. Auf andere untersuchte Krebszelllinien, die nicht aus hepatischem Gewebe stammen, konnte dieser Mechanismus mit den gezeigten Daten jedoch nicht übertragen werden.

INDUKTION DER APOPTOSE DURCH SIMVASTATIN

Die Behandlung der Zelllinien HepG2 und LS174T mit Simvastatin induziert in den Zellen die Apoptose. Dem vermuteten Wirkmechanismus über die Hemmung des Mevalonatwegs entsprechend, konnte dieser Effekt durch die gleichzeitige Gabe von Mevalonat wieder aufgehoben werden.

SILVESTROL IM ONKOGENEN KONTEXT

SILVESTROL HEMMT DIE TRANSLATION VON PIM-1

In einem Dual-Luziferase-Assay (DLA) wurde der Effekt einer Hemmung der Helikase eIF4A durch Silvestrol auf die Translationseffizienz des Proto-Onkogens Pim-1 untersucht. Es zeigte sich eine starke Reduktion der Translationseffizienz von Pim-1, die DLA-Konstrukte der ebenfalls untersuchten Haushaltsgene β -Actin und β -Globin wurden im Experiment weitgehend unbeeinflusst translatiert.

SILVESTROL ZEIGT KEINEN EINFLUSS AUF G-QUADRUPLEXE

Auf die untersuchten G-Quadruplexe von Zic-1 zeigt die Hemmung von eIF4A keinen Einfluss. Die Translationseffizienz unter Silvestrolgabe ist bei einem mutierten, nicht funktionalen, G-Quadruplex vergleichbar mit dem intakten G-Quadruplex.

STRESSINDUZIERTER RESISTENZ VON PIM-1 GEGEN SILVESTROL

Unter Tunicamycin induziertem ER-Stress, konnte auf Proteinebene eine Unempfindlichkeit gegenüber Silvestrol in HepG2-Zellen beschrieben werden. Der zuvor beobachtete Effekt auf Pim-1 verschwand; da eine bereits beschriebene IRES-Struktur von Pim-1 nicht durch ER-Stress aktiviert werden kann, bleibt eine Erklärung dieser Beobachtung noch offen.

SILVESTROL IM VIRALEN KONTEXT

ANTIVIRALE WIRKUNG VON SILVESTROL GEGEN HIV

In einem DLA wurde zunächst eine starke Reduktion der Translationseffizienz der viralen 5'UTR von HIV gezeigt und diese Wirkung dann in Zellkulturexperimenten, kooperierender Labore, bestätigt.

ANTIVIRALE WIRKUNG AUF EBOV

DLA-Experimente bestätigen auch bei den 5'-UTRs des EBOV eine hemmende Wirkung auf die Translationsinitiation. Dieses Ergebnis konnte durch Kooperationspartner unter S4-Bedingungen im Zellkulturexperiment validiert werden.

ROLLE DER SEKUNDÄRSTRUKTUR EINER 5'-UTR

Die Ergebnisse aus DLAs mit Konstrukten verschiedener, modifizierter 5'-UTRs deuten auf eine zentrale Rolle der Sekundär-

struktur für die eIF4A-Abhängigkeit hin. Insbesondere 5' terminale Hairpin-Strukturen zeigten hierbei großen Einfluss.

SILVESTROL ZEIGT VIRALE BREITBAND-WIRKUNG

Es wurden die 5'-UTRs verschiedener anderer Viren untersucht, u.a. HCoV-229E, MERS-CoV, HRV-A1 und PV. Auch wenn die Wirkung im DLA, methodisch bedingt, nur bei Cap-abhängig translatierte 5'-UTRs zuverlässig untersucht werden konnte, deuten Infektions-Experiment von Kooperationspartnern auch bei PV und HRV-A1 auf eine antivirale Wirkung hin.

ZYTOTOXISCHE EIGENSCHAFTEN VON SILVESTROL

TOXIZITÄTSTESTS IN KREBSZELLINIEN

Die zytotoxischen Effekte wurden in verschiedenen Zelllinien untersucht und die toxischen Effekte entsprechend charakterisiert. Es wurden die Zellviabilität, -toxizität und Caspase 3/7-Aktivität bestimmt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den untersuchten Krebszelllinien im Schnitt ab etwa 10 nM Silvestrol eine toxische Wirkung auftrat.

TOXIZITÄTSTESTS IN PRIMÄREN ZELLEN

Um die Auswirkungen auf primäre Zellen zu beurteilen, wurden sowohl PBMCs als auch Makrophagen ausgewählt. Bei Letzteren konnte nach 48 Stunden Inkubation eine CC_{50} von etwa 90 nM ermittelt werden.

SILVESTROL-ANALOGA

Im Rahmen einer Kooperation mit einer synthetisch Arbeitenden Arbeitsgruppe, wurden Silvestrol-Analoga auf ihre toxikologischen Eigenschaften und ihre Wirkung auf die Translation hin getestet. Dabei wurden die Assays weiterentwickelt und das Testverfahren weiter optimiert.

ERWEITERTER DLA

Zur weiteren Optimierung des Testverfahrens neuer Verbindungen, wurde ein erweiterter DLA vorgestellt. Durch die Verwendung eines siRNA-vermittelten eIF4A-Knockdowns, wurden die erwähnten Analoga auf ihre eIF4A-Spezifität hin geprüft. Es wurde gezeigt, dass keine der getesteten Verbindungen spezifisch eIF4A inhibiert.

HELIKASE-ASSAY

Um mehrtägige Inkubationszeiten während des DLA zu vermeiden sollte ein Helikase-Assay nach dem Vorbild publizierter Beispiele angepasst und etabliert werden. Nachdem erste Versuche nicht zum Erfolg führten, wurde begonnen die Sekundärstruktur der eingesetzten RNA durch Probing experimentell zu bestätigen.

AUSBLICK

FAKTOREN FÜR EINE EIF4A-ABHÄNGIGKEIT

In dieser Arbeit konnten erste Hinweise auf die zugrundeliegenden Eigenschaften für eine eIF4A-Abhängigkeit bei den untersuchten 5'-UTRs gegeben werden. Weiterführende Untersuchungen sollten diese konkretisieren. Die Primärstruktur der Hairpins und auch deren minimale und maximale Länge, sollten systematisch auch in artifiziellen Modellen untersucht werden.

HIGH-THROUGHPUT SCREENING FÜR ANALOGA

Die bisherigen Versuche Analoga mit einer inhibitorischen Aktivität gegenüber eIF4A zu synthetisieren waren nicht erfolgreich. Ein weit vielversprechenderer Ansatz ist hier ein High-Throughput Screening mit Hilfe des vorgestellten DLAs oder auch dessen erweiterter Variante. Eine mögliche Kooperation mit dem Fraunhofer IME ScreeningPort in Hamburg ist denkbar.

VEREINFACHTE TESTS AUF EIF4A-EFFEKTE

Hierzu sind neben den vorgestellten DLAs auch die Etablierung eines funktionierenden Helikase-Assays notwendig. Dieser ermöglicht die Untersuchung von Substanzen, ohne dabei auf zeitintensive Zellkulturarbeiten angewiesen zu sein.

KRISTALLSTRUKTUR VON SILVESTROL UND EIF4A

Die Cokristallisation von eIF4A mit Silvestrol wird Erkenntnisse über das genaue Bindungsverhalten geben und so eine gezielte Strukturentwicklung ermöglichen.

EIF4A ALS ANTIVIRALE ZIELSTRUKTUR

Entscheidend bei der weiteren Arbeit in diesem Feld ist es, sich von der Leitsubstanz Silvestrol zu lösen und sich auf die Helikase eIF4A und damit die Translationsinitiation als Zielstruktur für antivirale Verbindungen zu konzentrieren.

LITERATURVERZICHNIS

- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., & Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line [15]. *Nature*, 282(5739), 615–616. <https://doi.org/10.1038/282615a0>
- Andreou, A. Z., & Klostermeier, D. (2013). The DEAD-box helicase eIF4A. *RNA Biology*, 10(1), 19–32. <https://doi.org/10.4161/rna.21966>
- Arora, A., Dutkiewicz, M., Scaria, V., Hariharan, M., Maiti, S., & Kurreck, J. (2008). Inhibition of translation in living eukaryotic cells by an RNA G-quadruplex motif. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(7), 1290–1296. <https://doi.org/10.1261/rna.1001708>
- ATCC. (2018a). LS 174T ATCC ® CL-188™ Homo sapiens colon Dukes' type B,colo. Retrieved January 20, 2018, from <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CL-188.aspx#characteristics>
- ATCC. (2018). SK-OV-3 [SKOV-3; SKOV3] ATCC ® HTB-77™ Homo sapiens ovary: a. Retrieved January 20, 2018, from <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-77.aspx#characteristics>
- Bachmann, M., & Möröy, T. (2005). The serine/threonine kinase Pim-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(4), 726–730. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2004.11.005>
- Badia, R., Ballana, E., Esté, J. A., & Riveira-Muñoz, E. (2017). Antiviral treatment strategies based on gene silencing and genome editing. *Current Opinion in Virology*, 24, 46–54. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2017.04.001>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Baudouin Gerard, †, Sheharbano Sangji, ‡, Daniel J. O'Leary, ‡ and, & John A. Porco, J. *. (2006). Enantioselective Photocycloaddition Mediated by Chiral Brønsted Acids: Asymmetric Synthesis of the Rocaglamides. <https://doi.org/10.1021/JA062621J>
- Baudouin Gerard, Guilford Jones II, and, & John A. Porco, J. . (2004). A Biomimetic Approach to the Rocaglamides Employing Photogeneration of Oxidopyryliums Derived from 3-Hydroxyflavones. <https://doi.org/10.1021/JA044798O>

- Baumeister. (1885). Hippokrates. In *Denkmäler des klassischen Altertums* (Vol. Band I, p. 694).
- Bedi, O., Dhawan, V., Sharma, P. L., & Kumar, P. (2016). Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 389(7), 695–712. <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1252-4>
- Biedenkopf, N., Lange-Grünweller, K., Schulte, F. W., Weißer, A., Müller, C., Becker, D., ... Grünweller, A. (2017). The natural compound silvestrol is a potent inhibitor of Ebola virus replication. *Antiviral Research*, 137, 76–81. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2016.11.011>
- Biolabs, N. E. (2012). Gibson Assembly Master Mix. *Manual*, 1–16. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7585>
- Brown, M. S., Faust, J. R., Goldstein, J. L., Kaneko, I., & Endo, A. (1978). Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(4), 1121–1128. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/624722>
- Cencic, R., Carrier, M., Galicia-Vázquez, G., Bordeleau, M.-E., Sukarieh, R., Bourdeau, A., ... Pelletier, J. (2009). Antitumor Activity and Mechanism of Action of the Cyclopenta[b]benzofuran, Silvestrol. *PLoS ONE*, 4(4), e5223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005223>
- Cencic, R., Galicia-Vázquez, G., & Pelletier, J. (2012). Inhibitors of Translation Targeting Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A. *Methods in Enzymology*, 511, 437–461. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396546-2.00020-6>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2016). 2014 Ebola Outbreak in West Africa - Reported Cases Graphs | Ebola Hemorrhagic Fever | CDC. Retrieved April 12, 2018, from <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/2014-west-africa/cumulative-cases-graphs.html>
- CLS Cell Lines Service GmbH. (2018). HUH7. Retrieved January 21, 2018, from <http://clsgmbh.de/abilder/huh7-10x01-sm.jpg>
- Colditz, G. A., Sellers, T. A., & Trapido, E. (2006). Epidemiology — identifying the causes and preventability of cancer? *Nature Reviews Cancer*, 6(1), 75–83. <https://doi.org/10.1038/nrc1784>
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(5), 502–511.

<https://doi.org/10.1056/NEJMra072367>

- Dávalos, A., Goedeke, L., Smibert, P., Ramírez, C. M., Warriar, N. P., Andreo, U., ... Fernández-Hernando, C. (2011). miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(22), 9232–9237. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102281108>
- Davey, A. E., Schaeffer, M. J., & Taylor, R. J. K. (1991). Synthesis of the novel anti-leukaemic tetrahydrocyclopenta[b]benzofuran, rocaglamide. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 0(16), 1137. <https://doi.org/10.1039/c39910001137>
- Davies, J. T., Delfino, S. F., Feinberg, C. E., Johnson, M. F., Nappi, V. L., Olinger, J. T., ... Swanson, H. I. (2016). Current and Emerging Uses of Statins in Clinical Therapeutics: A Review. *Lipid Insights*, 9, LPI.S37450. <https://doi.org/10.4137/LPI.S37450>
- Dobler, M. R., Bruce, I., Cederbaum, F., Cooke, N. G., Diorazio, L. J., Hall, R. G., & Irving, E. (2001). Total synthesis of (±)-rocaglamide and some aryl analogues. *Tetrahedron Letters*, 42(47), 8281–8284. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)01807-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)01807-X)
- Endo, A. (2010). A historical perspective on the discovery of statins. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 86(5), 484–493. <https://doi.org/10.2183/pjab.86.484>
- Fay, M. M., Lyons, S. M., & Ivanov, P. (2017). RNA G-Quadruplexes in Biology: Principles and Molecular Mechanisms. *Journal of Molecular Biology*, 429(14), 2127–2147. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.017>
- Fears, R., Richards, D. H., & Ferres, H. (1980). The effect of compactin, a potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase activity, on cholesterologenesis and serum cholesterol levels in rats and chicks. *Atherosclerosis*, 35(4), 439–449. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(80\)90185-9](https://doi.org/10.1016/0021-9150(80)90185-9)
- Fernandez, J., Yaman, I., Sarnow, P., Snider, M. D., Hatzoglou, M., & Ave, E. (2002). Regulation of Internal Ribosomal Entry Site-mediated Translation by Phosphorylation of the Translation Initiation Factor eIF2 α . <https://doi.org/10.1074/jbc.M201052200>
- Frederick A. Murphy (CDC). (n.d.). colorized transmission electron microscopic (TEM) image of an Ebola virus virion. Retrieved April 12, 2018, from <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10815>
- Galicia-Vazquez, G., Cencic, R., Robert, F., Agenor, A. Q., & Pelletier, J. (2012). A cellular response linking eIF4A1 activity to eIF4A1 transcription. *RNA*, 18(7), 1373–1384.

<https://doi.org/10.1261/rna.033209.112>

- Gelderblom, H. R. (RKI). (2014). HIV-1 (retroviruses). Retrieved from https://www.rki.de/SharedDocs/Bilder/InfAZ/HIVAIDS/EM_10_16177c_HIV-1_TIF.tif?__blob=publicationFile&v=6
- Gerard, B., Cencic, R., Pelletier, J., & Porco, J. A. (2007). Enantioselective Synthesis of the Complex Rocaglate (–)-Silvestrol. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(41), 7831–7834. <https://doi.org/10.1002/anie.200702707>
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., & Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1417–1423. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4357758>
- Guo, J. U., & Bartel, D. P. (2016). RNA G-quadruplexes are globally unfolded in eukaryotic cells and depleted in bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6306), aaf5371. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5371>
- Gürgelsiepe, H., & Hartmann, R. K. (2005). *Antisense-Inhibition der bakteriellen RNase P*. Philipps-Universität Marburg.
- Haimov, O., Sinvani, H., & Dikstein, R. (2015). Cap-dependent, scanning-free translation initiation mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(11), 1313–1318. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2015.09.006>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. *Cell*, 100, 57–70. Retrieved from https://ac.els-cdn.com/S0092867400816839/1-s2.0-S0092867400816839-main.pdf?_tid=6bf52c6b-bb94-48be-9c7f-b8ec979001e2&acdnat=1522354886_d7a40156c2a6c9e2753b0742d9d75556
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harms, U., Andreou, A. Z., Gubaev, A., & Klostermeier, D. (2014). eIF4B, eIF4G and RNA regulate eIF4A activity in translation initiation by modulating the eIF4A conformational cycle. *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7911–7922. <https://doi.org/10.1093/nar/gku440>
- He, L., & Hannon, G. J. (2004). Erratum: MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522–531. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>

- Hernández, G. (2008). Was the initiation of translation in early eukaryotes IRES-driven? *Trends in Biochemical Sciences*, 33(2), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.11.002>
- Hershey, J. W. B., Sonenberg, N., & Mathews, M. B. (2012). Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), a011528. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011528>
- Hilbert, M., Karow, A. R., & Klostermeier, D. (2009). The mechanism of ATP-dependent RNA unwinding by DEAD box proteins. *Biol. Chem*, 390, 1237–1250. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.135>
- Hof, H., Dörries, R., Geginat, G., Schlüter, D., & Wendt, C. (2017). *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-004-140256>
- Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>
- Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müßig, A., Allers, K., ... Thiel, E. (2009). Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 360(7), 692–698. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802905>
- Jackson, R. J., T Hellen, C. U., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
- Kayser, F. H., Böttger, E. C., Deplazes, P., Haller, O., & Roers, A. (Eds.). (2014). *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-002-98020>
- Kim, S., Bang, Y. H., Su, B. N., Chai, H., Mi, Q., Kinghorn, A. D., ... Swanson, S. M. (2007). Silvestrol, a potential anticancer rocaglate derivative from *Aglaia foveolata*, induces apoptosis in LNCaP cells through the mitochondrial/apoptosome pathway without activation of executioner caspase-3 or -7. *Anticancer Research*, 27(4 B), 2175–2183. <https://doi.org/10.1016/j.humov.2008.02.015.Changes>
- Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., ... Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*, 37(5), 495–500. <https://doi.org/10.1038/ng1536>
- Leidi, M., Gotti, E., Bologna, L., Miranda, E., Rimoldi, M., Sica, A., ... Golay, J. (2009). M2 macrophages phagocytose rituximab-opsonized leukemic targets more efficiently than m1 cells in vitro. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(7), 4415–4422.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0713732>

- Leppek, K., Das, R., & Barna, M. (2017). Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(3), 158–174. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.103>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu King, M., Chiang, C.-C., Ling, H.-C., Fujita, E., Ochiai, M., & McPhail, A. T. (1982). X-Ray Crystal Structure of Rocaglamide, a Novel Antileukemic I H-Cyclopenta[b] benzofuran from Ag/aia elliptifo/ia. *J. CHEM. SOC., CHEM. COMMUN.* Retrieved from <http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/1982/c3/c39820001150>
- Macejak, D. G., & Sarnow, P. (1991). Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature*, 353(6339), 90–94. <https://doi.org/10.1038/353090a0>
- Mérens, A., Bigaillon, C., & Delaune, D. (2018). Ebola virus disease: Biological and diagnostic evolution from 2014 to 2017. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 48(2), 83–94. <https://doi.org/10.1016/J.MEDMAL.2017.11.002>
- Messaoudi, I., Amarasinghe, G. K., & Basler, C. F. (2015). Filovirus pathogenesis and immune evasion: insights from Ebola virus and Marburg virus. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 663–676. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3524>
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., & Schätzl, H. (2010). *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2241-5>
- Mühlberger, E., Trommer, S., Funke, C., Volchkov, V., Klenk, H.-D., & Becker, S. (1996). Termini of All mRNA Species of Marburg Virus: Sequence and Secondary Structure. *Virology*, 223(2), 376–380. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1996.0490>
- Müller, C., Schulte, F. W., Lange-Grünweller, K., Obermann, W., Madhugiri, R., Pleschka, S., ... Grünweller, A. (2018). Broad-spectrum antiviral activity of the eIF4A inhibitor silvestrol against corona- and picornaviruses. *Antiviral Research*, 150, 123–129. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2017.12.010>
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., & Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research*, 42(9), 3858–3863. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6286115>

- Neumann, G., Watanabe, S., & Kawaoka, Y. (2009). Characterization of Ebolavirus regulatory genomic regions. *Virus Research*, 144(1–2), 1–7.
<https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2009.02.005>
- Niles, A. L., Moravec, R. A., Hesselberth, P. E., Scurria, M. A., Daily, W. J., & Riss, T. L. (2007). A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers, 366, 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.04.007>
- Pacheco, D. A. D. M. A. R., Rodrigues, A. A. G., & Da Silva, M. C. L. (2016). Ebola virus – from neglected threat to global emergency state. *Rev Assoc Med BrAs*, 62(5), 458–467.
<https://doi.org/10.1590/1806-9282.62.05.458>
- Pan, L., Woodard, J. L., Lucas, D. M., Fuchs, J. R., & Douglas Kinghorn, A. (2014). Rocaglamide, silvestrol and structurally related bioactive compounds from *Aglaia* species. *Nat. Prod. Rep.*, 31(7), 924–939. <https://doi.org/10.1039/C4NP00006D>
- Pesole, G., Mignone, F., Gissi, C., Grillo, G., Licciulli, F., & Liuni, S. (2001). Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene*, 276(1–2), 73–81.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00674-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00674-6)
- Poulin, F., & Sonenberg, N. (2013). Mechanism of Translation Initiation in Eukaryotes. Retrieved April 17, 2018, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6597/?report=printable>
- Proksch, P., Edrada, R., Ebel, R., Bohnenstengel, F. I. F., & Nugroho, B. B. W. (2001). Chemistry and Biological Activity of Rocaglamide Derivatives and Related Compounds in *Aglaia* Species (Meliaceae). *Current Organic Chemistry*, 5(9), 923–938.
<https://doi.org/10.2174/1385272013375049>
- Promega Corporation. (2015). ApoTox-Glo™ Triplex Assay Instructions for Use of Products G6320 and G6321, 608–277. Retrieved from <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/apotox-glo-triplex-assay-protocol.pdf?la=de-de>
- Robert Koch-Institut. (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. *Bericht Zum Krebsgeschehen in Deutschland*. <https://doi.org/10.17886/rkipubl-2016-014>
- Robinson, R., Lee, S., Wang, J., Ince, N., & Ouyang, N. (2004). RNAi Therapeutics: How Likely, How Soon? *PLoS Biology*, 2(1), e28. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020028>
- Rogers, G. W., Lima, W. F., & Merrick, W. C. (2001). Further characterization of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12598–12608. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007560200>

- Rogers, G. W., Richter, N. J., & Merrick, W. C. (1999). Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(18), 12236–12244. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.18.12236>
- Rosbach, O., & Bindereif Albrecht. (2015). Nicht-kodierende RNAs: Neue diagnostische und therapeutische Zielstrukturen? *Pharmakon*, 4, 255–262. <https://doi.org/10.1691/pn.20150023>
- Rougeron, V., Feldmann, H., Grard, G., Becker, S., & Leroy, E. M. (2015). Ebola and Marburg haemorrhagic fever. *Journal of Clinical Virology*, 64, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.01.014>
- Rubio, C. A., Weisburd, B., Holderfield, M., Arias, C., Fang, E., DeRisi, J. L., & Fanidi, A. (2014). Transcriptome-wide characterization of the eIF4A signature highlights plasticity in translation regulation. *Genome Biology*, 15(10), 476. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0476-1>
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral Actions of Interferons, 14(4), 778–809. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.778>
- Saradhi, U. V. R. V., Gupta, S. V., Chiu, M., Wang, J., Ling, Y., Liu, Z., ... Chan, K. K. (2011). Characterization of silvestrol pharmacokinetics in mice using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *The AAPS Journal*, 13(3), 347–356. <https://doi.org/10.1208/s12248-011-9273-x>
- Schatz, J. H., Oricchio, E., Wolfe, A. L., Jiang, M., Linkov, I., Maragulia, J., ... Wendel, H.-G. (2011, August 29). Targeting cap-dependent translation blocks converging survival signals by AKT and PIM kinases in lymphoma. <https://doi.org/10.1084/jem.20110846>
- Schmidt, O. (2016). *Genetik und Molekularbiologie*. (Olaf Fritsche, Ed.). Essen: Springer-VerlagBerlinHeidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-50274-7>
- Sirtori, C. R. (2014). The pharmacology of statins. *Pharmacological Research*, 88, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.03.002>
- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4), 731–745. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>
- Statistisches Bundesamt (Destatis). (n.d.). Sterbefälle 2015 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10. Retrieved April 3, 2018, from <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen>

/Tabellen/HaeufigsteTodesursachen.html

Statistisches Bundesamt (Destatis). (2018). Todesursachen nach Krankheiten 2015. Retrieved April 9, 2018, from <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>

Stewart, M. W. (2010). Optimal management of cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 4, 285–299. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463796>

The Global Health Chronicles. (1977). SMALLPOX LAST CASE · The Global Health Chronicles. Retrieved April 11, 2018, from <https://globalhealthchronicles.org/items/show/3349>

the National Cancer Institute. (2018). Types of Cancer Treatment - National Cancer Institute. Retrieved April 4, 2018, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>

Thiery, J., & Brügel, M. (2003). Pleiotrope Effekte der Statine: Wirken Statine nurüber LDL-Senkung? *Pharmazie in Unserer Zeit*, 32(6), 472–478. <https://doi.org/10.1002/pauz.200300046>

Thomas, M., Lange-Grünweller, K., Weirauch, U., Gutsch, D., Aigner, a, Grünweller, a, & Hartmann, R. K. (2012). The proto-oncogene Pim-1 is a target of miR-33a. *Oncogene*, 31(7), 918–928. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.278>

Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330), 314–322. <https://doi.org/10.1038/nature09781>

Weirauch, U., Beckmann, N., Thomas, M., Grünweller, A., Huber, K., Bracher, F., ... Aigner, A. (2013). Functional role and therapeutic potential of the pim-1 kinase in colon carcinoma. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 15(7), 783–794. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23814490>

Wienholds, E., & Plasterk, R. H. A. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Letters*, 579(26), 5911–5922. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.070>

Wolfe, A. L., Singh, K., Zhong, Y., Drewe, P., Rajasekhar, V. K., Sanghvi, V. R., ... Wendel, H.-G. (2014). RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature13485>

Yin, L.-M., Wei, Y., Wang, Y., Xu, Y.-D., & Yang, Y.-Q. (2013). Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth

muscle cells. *International Journal of Medical Sciences*, 10(1), 68–72.

<https://doi.org/10.7150/ijms.5256>

Zhang, Y., Wang, Z., & Magnuson, N. S. (2007). Pim-1 kinase-dependent phosphorylation of p21Cip1/WAF1 regulates its stability and cellular localization in H1299 cells. *Molecular Cancer Research : MCR*, 5(9), 909–922. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0388>

ANHANG

ERKLÄRUNG

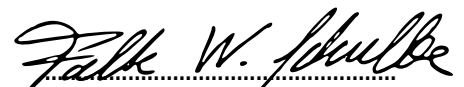
Ich versichere, dass ich meine Dissertation

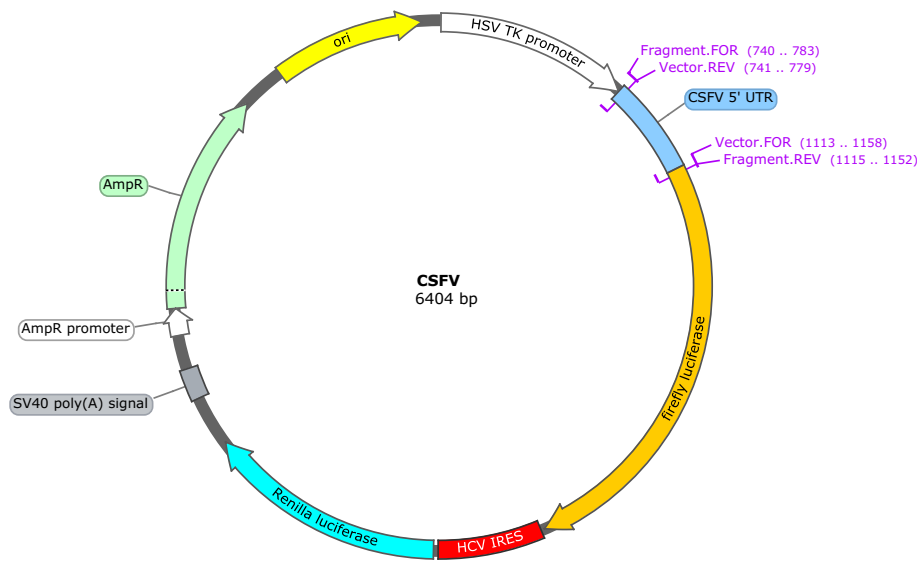
**“Untersuchung der antiviralen Wirkung des Naturstoffs Silvestrol
– Etablierung der Helikase eIF4A als neue antivirale Zielstruktur“**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Bergkamen, den 07.03.2019


(Falk Wilhelm Schulte)



Fragment.FOR

5' ... CCCTGCAGCGACCCGCTTAAGtatacagaggttagctcgtcc

3' ... GCACACCGGAGCTTGTGGCTCGCTGGGACGTCGCTGGGCGAATTcatatgctccaatcgagcagg

HSV TK promoter

CSFV 5' UTR

Vector.REV

GGACGTCGCTGGGCGAATTcatatgctccaatcgagcag

Fragment....

tcg

tcgtgtactacattggacaaactaaaattccgatttggcctagggtaccctccagcgacggccg

agcacatgatgtaacctgtttgattttaaggctaaccggatcccatggggaggtcgctgccggc

CSFV 5' UTR

aactgggctagccatgccacagtaggactagcaaacggagggactagccgtagtggcgagctcc

ttgaccgatcggtacgggtgtcatcctgatcggttgccctccctgatcggcataccgctcgagg

CSFV 5' UTR

ctgggtggtcctaagtctgagtacaggacagtcgtcagtagttcgacgtgagcaggagccacct

gaccaccagattcaggactcatgtcctgtcagcagtcataagctgcactcgtcctcgggtgga

CSFV 5' UTR

cgagatgctatgtggacgagggcatgcccaagacacaccttaaccctggcgggggtgccagggt

gctctacgatacacctgctccgtacgggttctgtgtggaattgggaccgccccagcggtccca

CSFV 5' UTR

gaaatcacaccatgtgatgggggtacgacctgatagggtgctgcagaggccactaacaggctag

ctttagtgtgtacactaccccatgctggactatcccacgacgtctccgggtgattgtccgatc

CSFV 5' UTR

Vector.FOR

atctctgtgtacatggcacATGGAAAGACGCCAAAAACATAAAGAA

tataaaaaatctctgtgtacatggcacATGGAAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCGGCGCC

atatttttagagacgacatgtaccgtgTACCTTCTGCGGTTTTTGTATTTCTTTCCGGGCCGCGG



CSFV 5' UTR

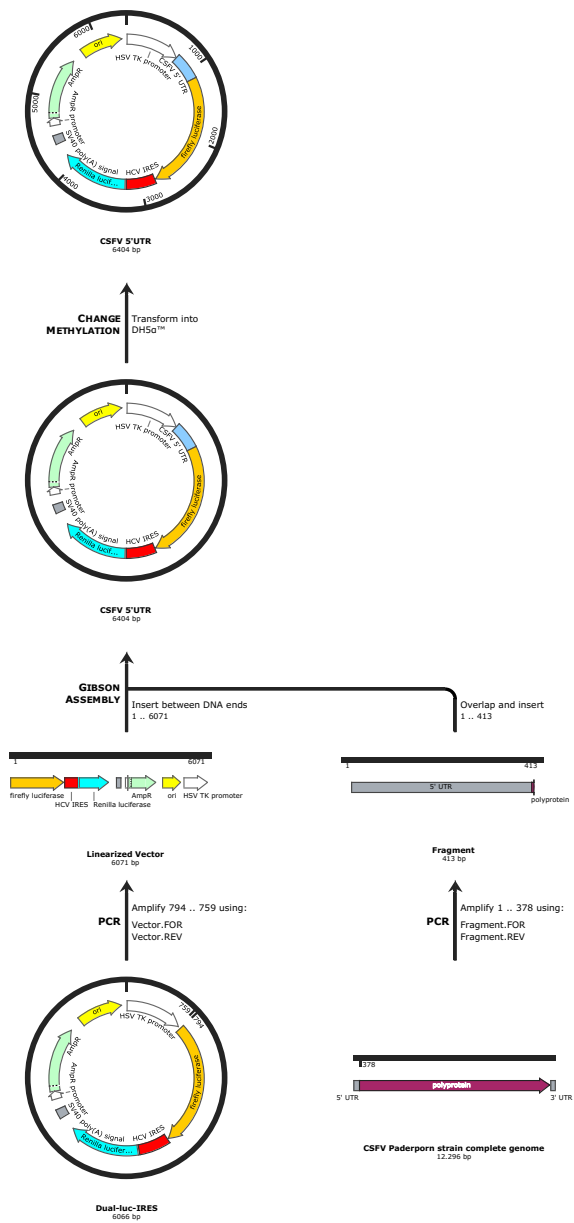
firefly luciferase

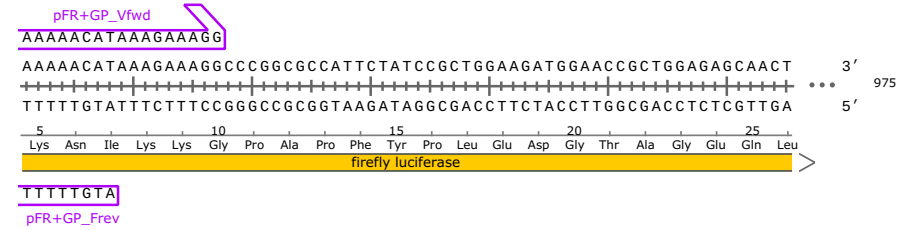
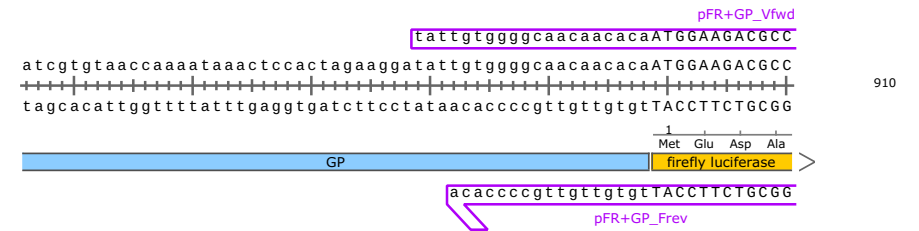
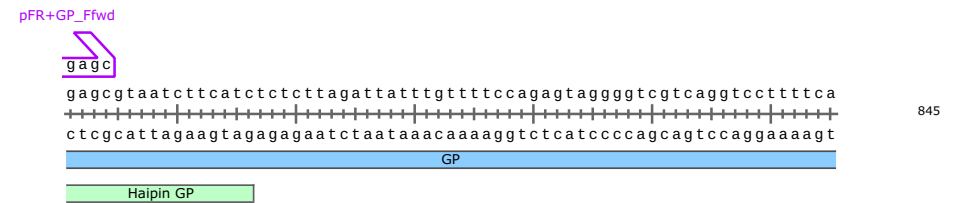
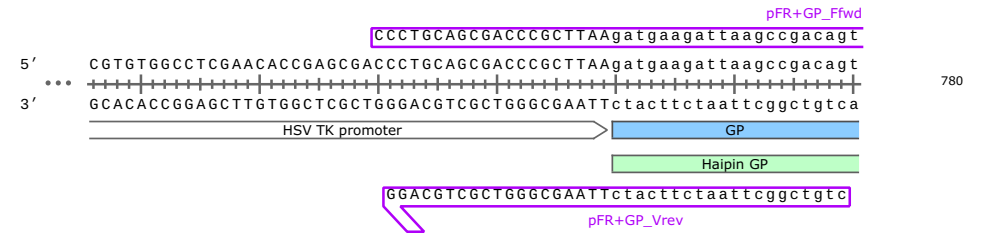
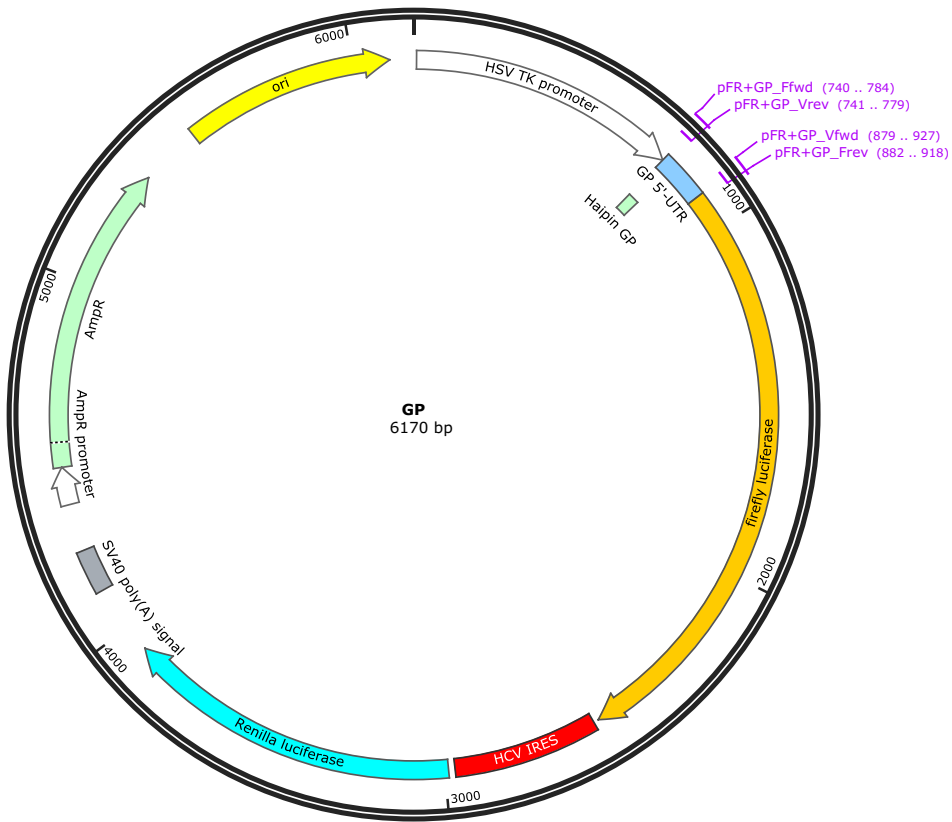
Fragment.REV

gagacgacatgtaccgtgTACCTTCTGCGGTTTTTGTATTTCTTTCCGGGCCGCGG

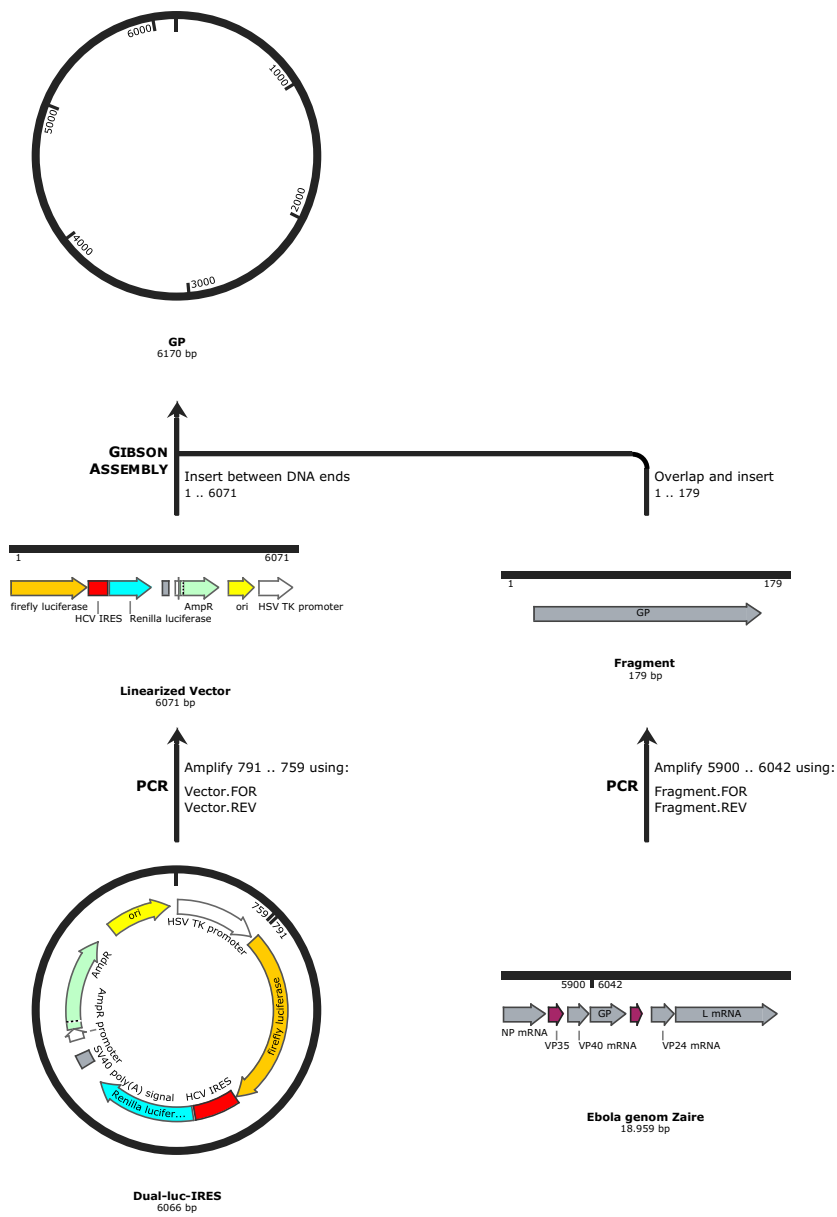
1 Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro

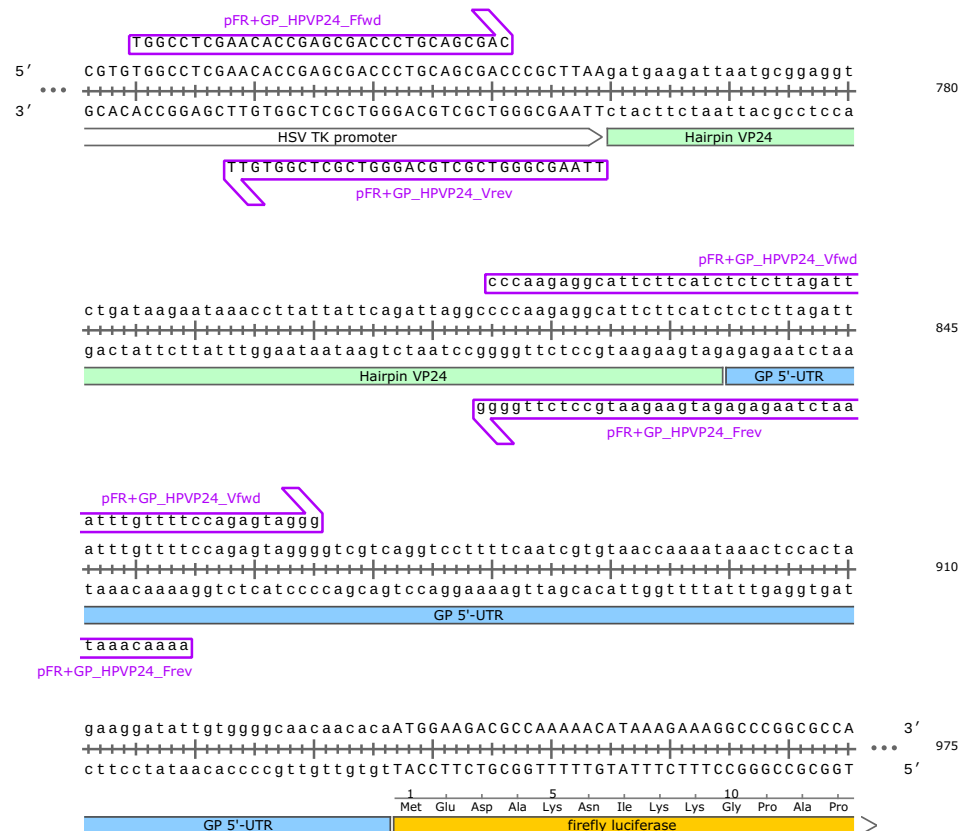
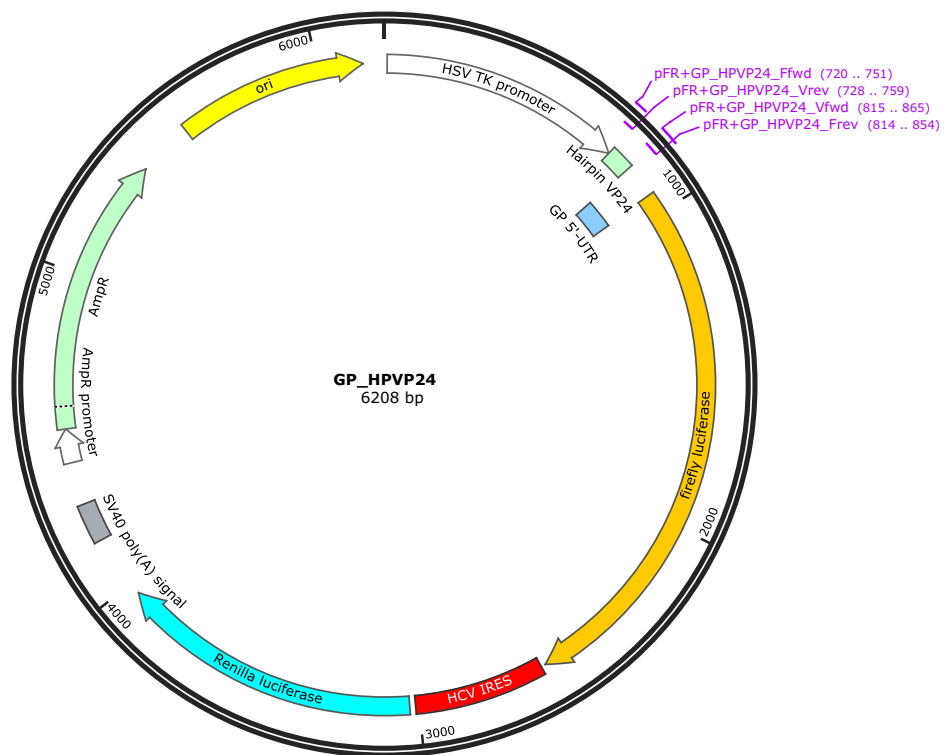
Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ Fragment.FOR	44-mer	740 .. 783		73°C
/sequence	= CCCTGCAGCGACCCGCTTAgtatacgaggttagctgcctctcg			
	59% GC / 13.444,7 Da			
✓ Vector.REV	39-mer	741 .. 779		70°C
/sequence	= gacgagctaacctcgatatacTTAAGCGGGTCGCTGCAGG			
	56% GC / 12.032,9 Da			
✓ Vector.FOR	46-mer	1113 .. 1158		69°C
/sequence	= atctctgctgtacatggcacATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAA			
	41% GC / 14.177,3 Da			
✓ Fragment.REV	38-mer	1115 .. 1152		69°C
/sequence	= ATGTTTTGGCGTCTCCATgtgccatgtacagcagag			
	47% GC / 11.690,7 Da			








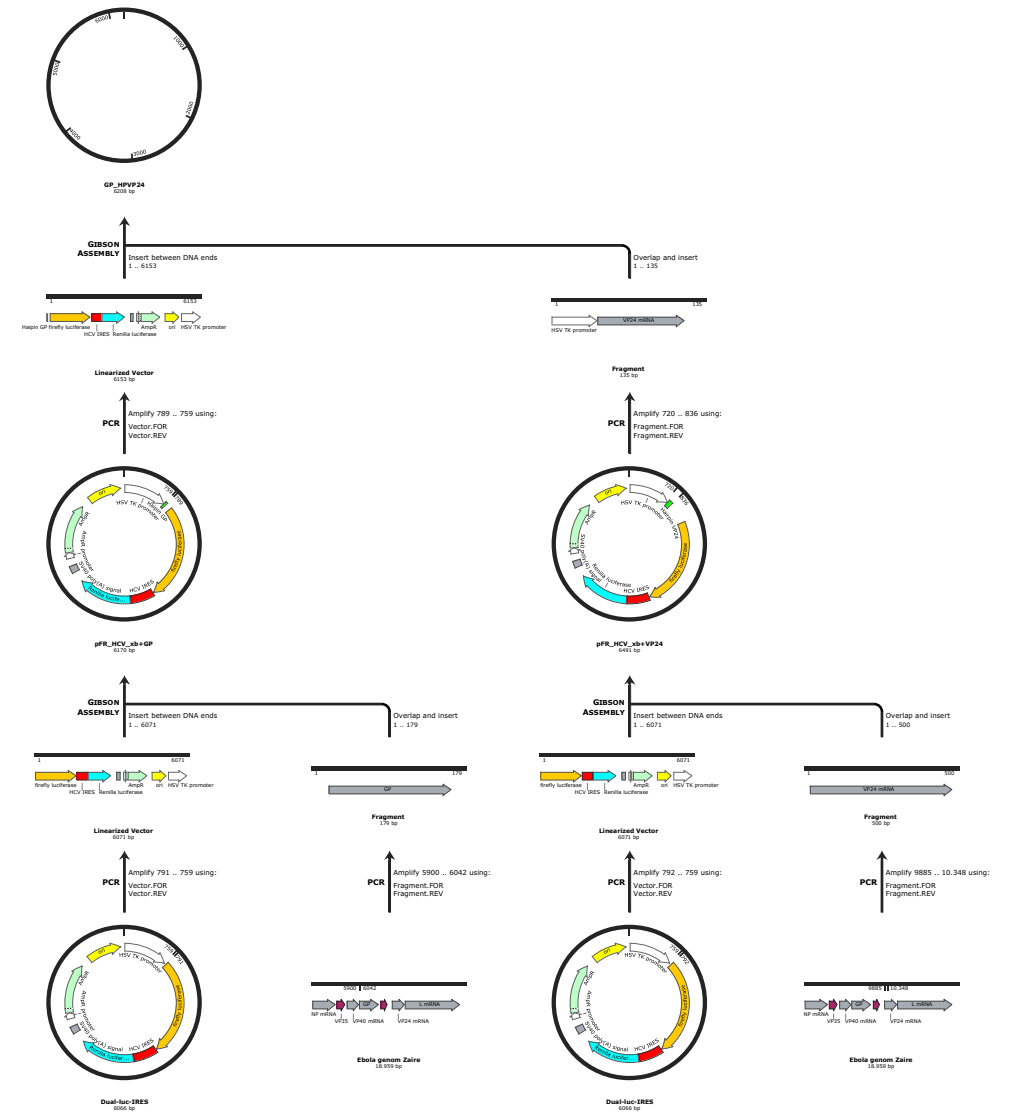


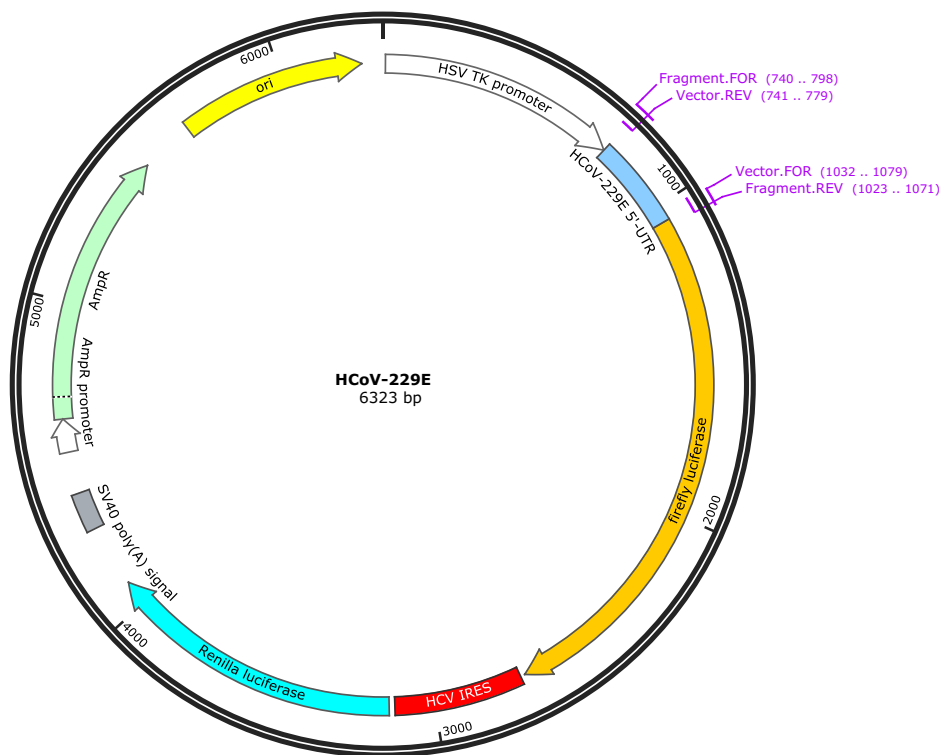
Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+GP_Ffwd	45-mer	740 .. 784	⇌	72°C
/sequence	= CCCTGCAGCGACCCGCTTAAgatgaagattaagccgacagtgagc 56% GC / 13.849,0 Da			
✓ pFR+GP_Vrev	39-mer	741 .. 779	⇌	70°C
/sequence	= ctgtcggcttaattcttcacTTAAGCGGGTCGCTGCAGG 54% GC / 11.980,8 Da			
✓ pFR+GP_Vfwd	49-mer	879 .. 927	⇌	68°C
/sequence	= tatttggggcaacaacacaATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGG 41% GC / 15.231,0 Da			
✓ pFR+GP_Frev	37-mer	882 .. 918	⇌	69°C
/sequence	= ATGTTTTGGCGTCTCCATgtgtgtgtgccccaca 46% GC / 11.294,4 Da			





Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+GP_HPVP24_Ffwd	32-mer	720 .. 751		75°C
/sequence	=	TGGCCTCGAACACCGAGCGACCTGCAGCGAC 69% GC / 9765,3 Da		
✓ pFR+GP_HPVP24_Vrev	32-mer	728 .. 759		73°C
/sequence	=	TTAAGCGGGTCGCTGCAGGGTCGCTCGGTGTT 63% GC / 9919,5 Da		
✓ pFR+GP_HPVP24_Frev	41-mer	814 .. 854		64°C
/sequence	=	aaaacaaataatctaagagagatgaagaatgcctctgggg 37% GC / 12.747,4 Da		
✓ pFR+GP_HPVP24_Vfwd	51-mer	815 .. 865		67°C
/sequence	=	cccaagaggcatctctcatctctctagattattgtttccagagtaggg 41% GC / 15.636,2 Da		





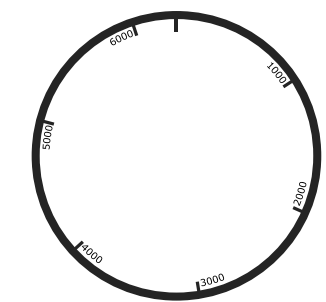
Fragment.FOR
 CCCTGCAGCGACCCGCTTAACTTAAGTACCTTATCTATCT
 5' CGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCCTGCAGCGACCCGCTTAACTTAAGTACCTTATCTATCT
 ...
 3' GCACACCGGAGCTTGTGGCTCGCTGGGACGTCGCTGGGCGAATTTGAATTCATGGAATAGATAGA
 HSV TK promoter HCoV-229E 5'-UTR
 GGACGTCGCTGGGCGAATTTGAATTCATGGAATAGATAG
 Vector.REV

Fragment.FOR
 ACAGATAGAAAAGTTGCT
 ACAGATAGAAAAGTTGCTTTTGTAGACTTTGTGTCTACTTTTCTCAACTAAACGAAATTTTGCTA
 ...
 TGTCTATCTTTTCAACGAAAATCTGAAACACAGATGAAAAGAGTTGATTGCTTTAAAAACGAT
 HCoV-229E 5'-UTR
 TGGCCGGCATCTTTGATGCTGGAGTCGTAGTGTAATTGAAATTTTCATTTGGGTTGCAACAGTTTG
 ...
 ACCGGCCGTAGAAATACGACCTCAGCATCACATTAACTTTAAAGTAAACCAACGTTGTCAAAC
 HCoV-229E 5'-UTR
 GAAGCAAGTGCTGTGTGTCCTAGTCTAAGGGTTTCGTGTTCCGTCACGAGATTCCATTCTACAAA
 ...
 CTTCGTTCACGACACACAGGATCAGATTCCCAAAGCACAAGGCAGTGCTCTAAGGTAAGATGTTT
 HCoV-229E 5'-UTR

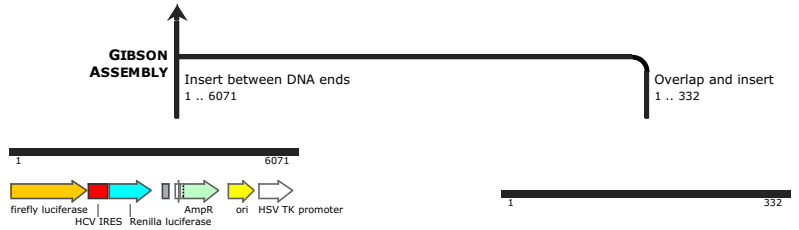
Vector.FOR
 GAAACCACT
 CGCCTTACTCGAGGTTCCGTCTCGTGTGTTGTGTTGGAAGCAAAGTTCTGTCTTTGTGGAACCACT
 ...
 GCGGAATGAGCTCCAAGGCAGAGCACAACACACCTTCGTTTCAAGACAGAAACACCTTTGGTCA
 HCoV-229E 5'-UTR
 CAGAAACACCTTTGGTCA
 Fragment.REV

Vector.FOR
 AACTGTTTCTAATGGAAGACGCCAAAAACATAAGAAAG
 AACTGTTTCTAATGGAAGACGCCAAAAACATAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAA
 ...
 TTGACAAGGATTACCTTCTGCGGTTTTTGTATTTCTTCCGGGCGCGGTAAGATAGGCGACCTT
 1 Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro Leu Glu
 HCoV-229E 5'-UTR firefly luciferase
 TTGACAAGGATTACCTTCTGCGGTTTTTGTAT
 Fragment.REV

Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ Fragment.FOR	59-mer	740 .. 798	⇌	70°C
/sequence	= CCCTGCAGCGACCCGCTTAACTTAAGTACCTTATCTATCTACAGATAGAAAAGTTGCT 42% GC / 18.032,8 Da			
✓ Vector.REV	39-mer	741 .. 779	⇌	66°C
/sequence	= GATAGATAAGGTACTTAAGTTTAAGCGGTCGCTGCAGG 46% GC / 12.151,0 Da			
✓ Fragment.REV	49-mer	1023 .. 1071	⇌	68°C
/sequence	= ATGTTTTTGGCGCTCTCCATTAGGAACAGTTACTGGTTCCACAAAGAC 41% GC / 15.051,9 Da			
✓ Vector.FOR	48-mer	1032 .. 1079	⇌	65°C
/sequence	= GAAACCAGTAACTGTTCTAATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAG 38% GC / 14.836,8 Da			

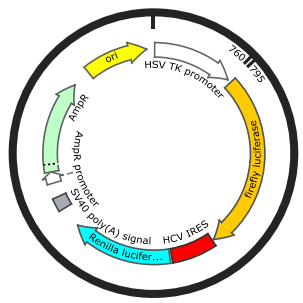


HCoV-229E
6323 bp



Linearized Vector
6071 bp

PCR Amplify 795 .. 760 using:
Vector.FOR
Vector.REV



Dual-luc-IRES
6066 bp

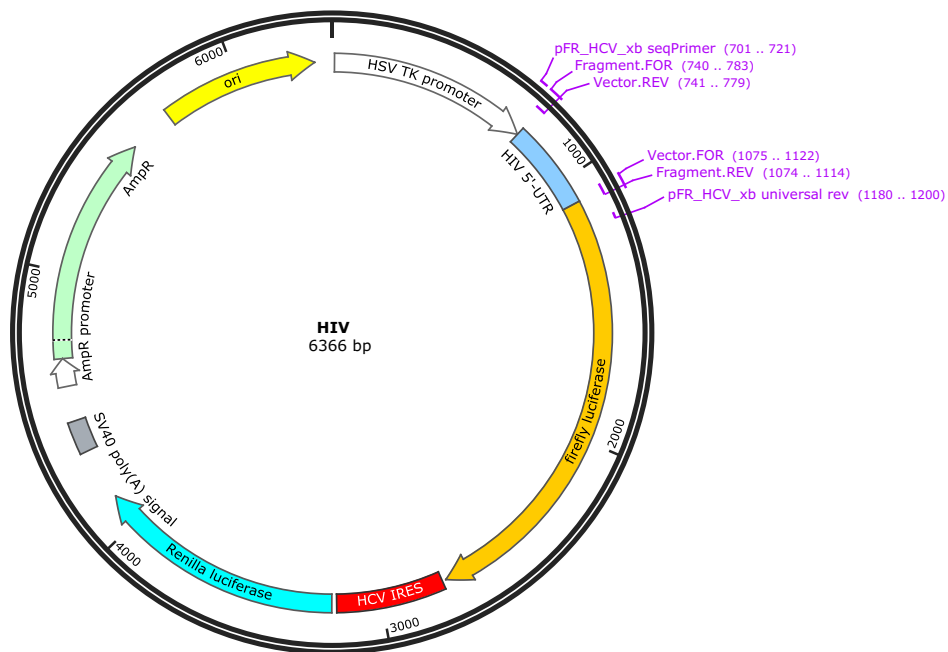


Fragment
332 bp

PCR Amplify 1 .. 292 using:
Fragment.FOR
Fragment.REV



229E 5'UTR
292 bp



Fragment.FOR
CCCTGCAGCGACCCGCTTAAGgtctctctggttagaccagatct

5' CGAGCGACCCCTGCAGCGACCCGCTTAAGgtctctctggttagaccagatctgagcctggga

3' GCTCGCTGGGACGTCGCTGGGCGAATTccagagagaccaatctggtctagactcggaccct

HSV TK promoter HIV 5'-UTR

GGACGTCGCTGGGCGAATTccagagagaccaatctggtc

Vector.REV

gctctctggctaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgacctgagtgtt

cgagagaccgattgatcccttgggtgacgaattcggagtatttcgaacggaactcacgaa

HIV 5'-UTR

caagtagtggtgcccgtctgttggtgactctggttaactagagatccctcagaccctttt

gttcatacacacgggcagacaacacactgagaccattgatctctagggagtctgggaaaa

HIV 5'-UTR

agtacgtgtgaaaaatctctagcagtggtgcccgaacagggaacctgaaagcgaaaggaaa

tcagtcacaccttttagagatgctcaccgggcttgctccctggactttcgtttcccttt

HIV 5'-UTR

ccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgagg

ggtctcctcgagagagctcgtctctgagccgaacgacttcgctgctgctcctccgctcc

HIV 5'-UTR

Vector.FOR
cggaggctagaaggagagagATGG

ggcggcgactggtgagtacgcaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagATGG

ccgccgtgaccactcatgcggtttttaaactgatcgctccgatcttctctctcTACC

HIV 5'-UTR

1 Met

firefly luciferase

cgctccgatcttctctctcTACC

Fragment.REV

Vector.FOR
AAGACGCCAAAAACATAAAGAAAAG

AAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATC

TTCTGCGGTTTTTGATTTCTTCCGGGCCGCGTAAGATAG

3' 1140

5'

5 10 15

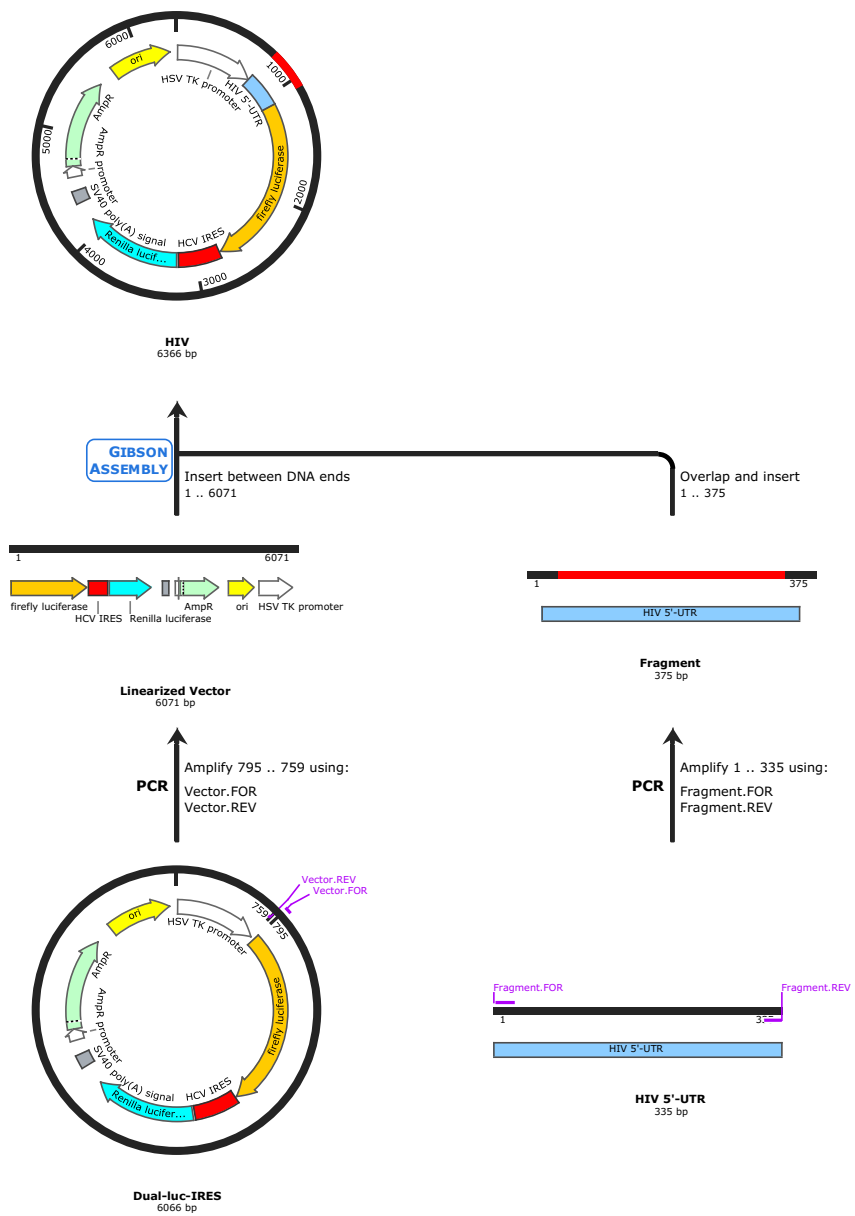
Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr

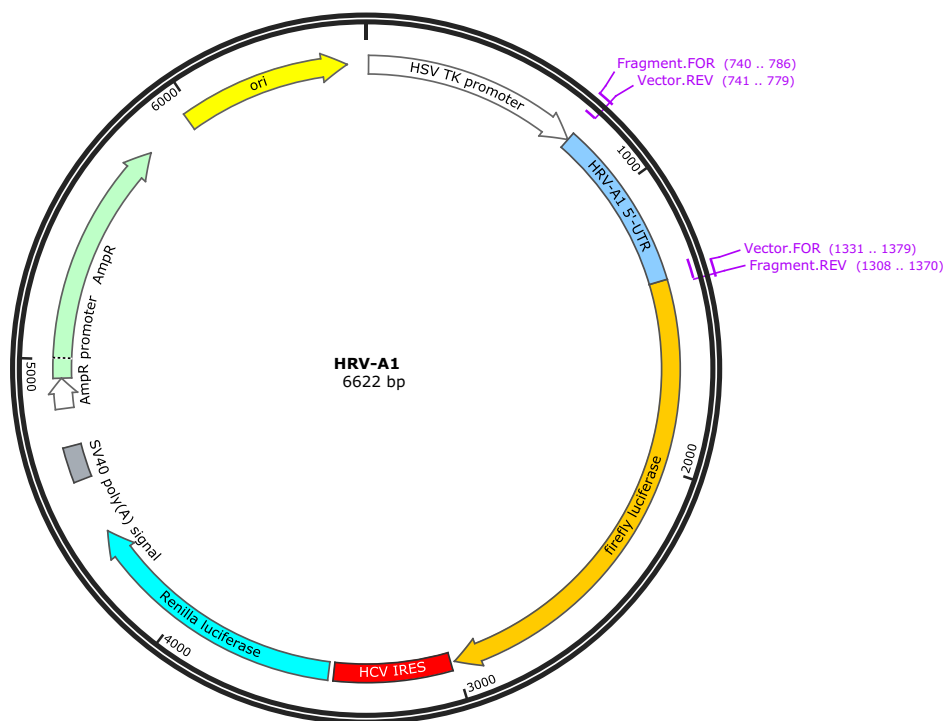
firefly luciferase

TTCTGCGGTTTTGTA

Fragment.REV

Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ Fragment.FOR	44-mer	740 .. 783	⇌	73°C
/sequence	= CCCTGCAGCGACCCGCTTAAggtctctctggttagaccagatct			
	57% GC / 13.419,7 Da			
✓ Vector.REV	39-mer	741 .. 779	⇌	72°C
/sequence	= ctggtctaaccagagagaccTTAAGCGGGTCGCTGCAGG			
	59% GC / 12.057,9 Da			
✓ Fragment.REV	41-mer	1074 .. 1114	⇌	70°C
/sequence	= ATGTTTTTGGCGTCTTCCATctctctcttagcctccgc			
	51% GC / 12.362,0 Da			
✓ Vector.FOR	48-mer	1075 .. 1122	⇌	69°C
/sequence	= cggaggctagaaggagagagATGGAAGACGCCAAAACATAAAGAAAG			
	46% GC / 15.056,9 Da			





Fragment.FOR
CCCTGCAGCGACCCGCTTAACccaatgggtgtgtactctg

5' CGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCCTGCAGCGACCCGCTTAACccaatgggtgtgtactctg

3' GCACACCGGAGCTTGTGGCTCGCTGGGACGTCGCTGGGCGAATTgggttaccacaacatgagac

HSV TK promoter

HRV-A1 5'-UTR

Vector.REV
GGACGTCGCTGGGCGAATTgggttaccacaacatgaga

Fragment.FOR
ttattc

ttattccggtaactttgtacgccagttttccctccctcccatcctttacgtaacttagaag

845

HRV-A1 5'-UTR

tttaaatacaagaccaatagtaggcaactctccaggtgtgctaaggtaagcacttctgtttcc

910

HRV-A1 5'-UTR

aaatttatgttctggttatcatccgttgagaggtccaacagattccagttcgtgaagacaagg

975

HRV-A1 5'-UTR

ccggttgatgttgatattgtcccaacagggcaaaaacaacagataccgttatccgcaaaagtgccta

1040

HRV-A1 5'-UTR

ggccaactacaactatacagaggtgtgccgttttgggtgctatggcaataggcgtttcacggat

1105

HRV-A1 5'-UTR

cacagagcttagtaggattctgaagatccttgggtggctgcagctgcataccagcagtaga

1170

HRV-A1 5'-UTR

gtgtctcgaatcatcctaagactttctagaaccaaccagcaagtcgacgtatgggtcgtcatct

1235

HRV-A1 5'-UTR

ccttgacagatgaggctggacattcccccactggtaacagtggtccagcctgcgtggctgcctgcgc

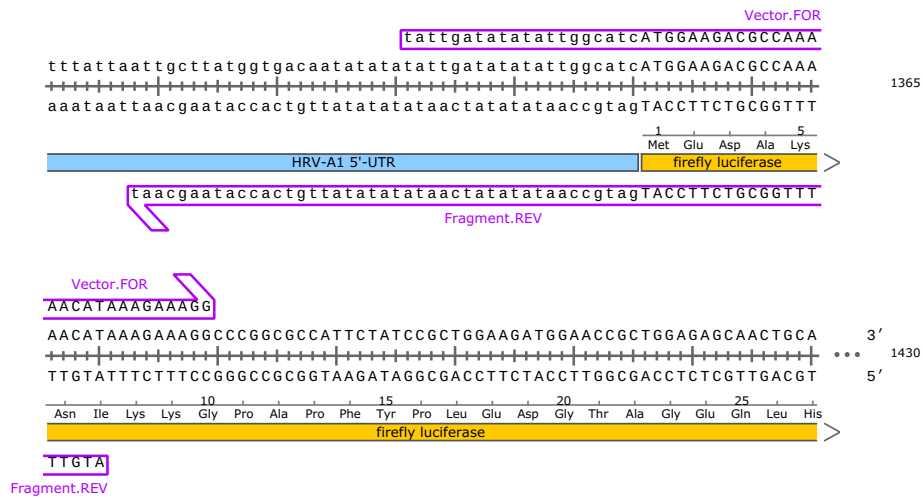
1300




HRV-A1 5'-UTR

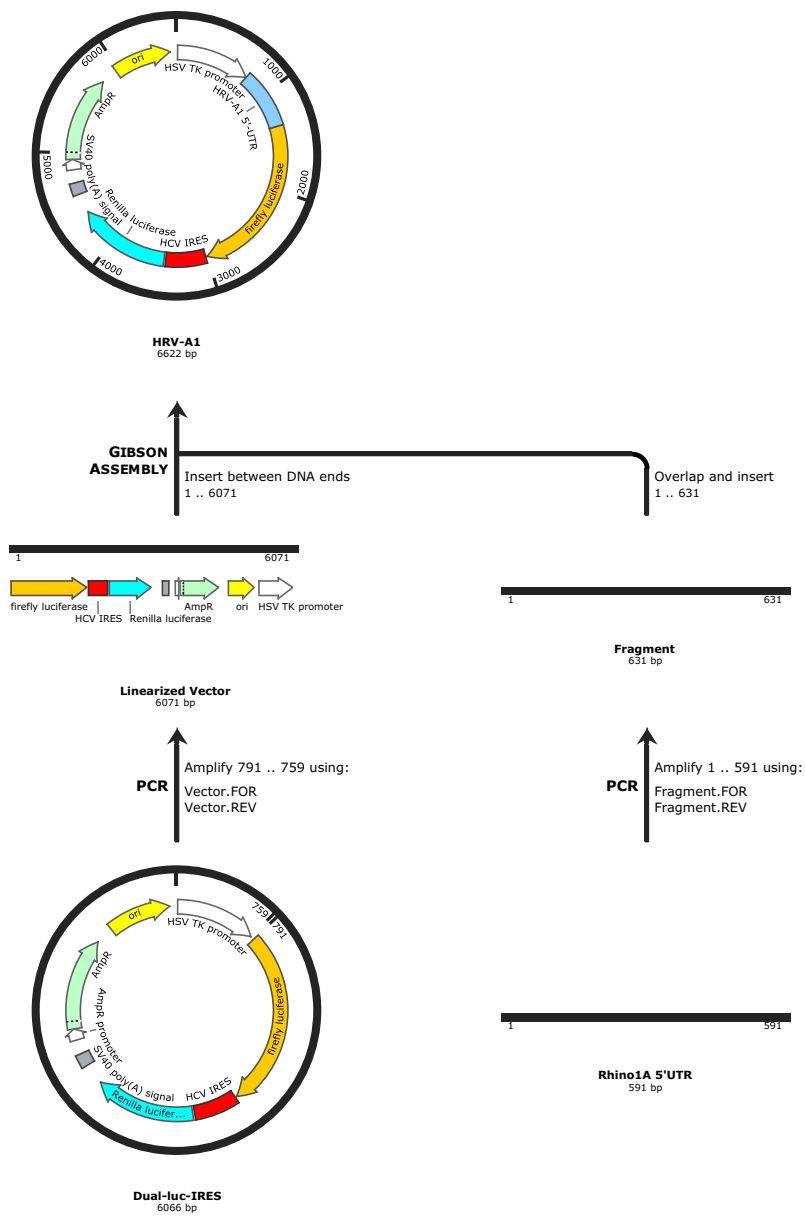
ggaacgtctactccgacctgtaaggggtgaccattgtcaccaggtgcggacgcaccgacggacg

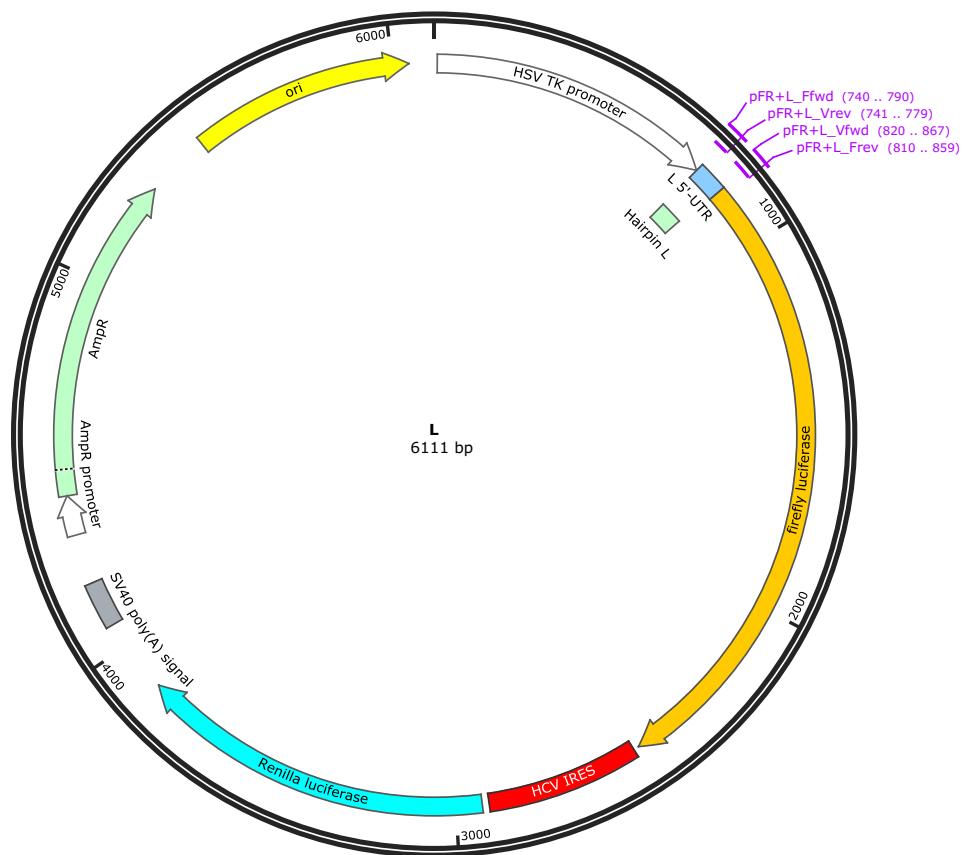
atggctcgtaacgagtaattgcgggatgggaccgactacttgggtgtccgtgtttcactttttcc

taccagattgctcattaaacgcctaccctggctgatgaaacccacaggcacaagtgaaaaagg



Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ Fragment.FOR	47-mer	740 .. 786		72°C
/sequence	= CCCTGCAGCGACCCGCTTAaccaatgggtgtgtactctgtattc 53% GC / 14.332,3 Da			
✓ Vector.REV	39-mer	741 .. 779		72°C
/sequence	= agagtacaacacccattgggTTAAGCGGGTCGCTGCAGG 56% GC / 12.081,9 Da			
✓ Fragment.REV	63-mer	1308 .. 1370		66°C
/sequence	= ATGTTTTTGGCGTCTTCCATgatgccaatatatatcaatatatatgttcaccataagcaat 30% GC / 19.317,7 Da			
✓ Vector.FOR	49-mer	1331 .. 1379		64°C
/sequence	= tattgatatatattggcatcATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGG 33% GC / 15.202,0 Da			





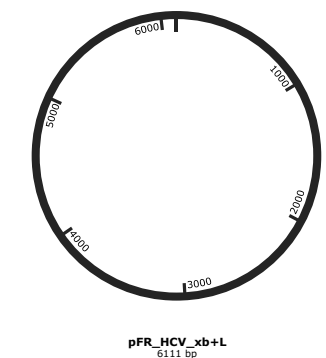
5' ATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGGCGCGGTCCCAAGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACG
 ...
 3' TAAGCTTGTGCGTCTACGTCAGCCCCGCCGCGCAGGGTCCAGGTGAAGCGTATAATTCCTACTGC
 HSV TK promoter

pFR+L_Fwd
 CCCTGCAGCGACCCGCTTAAGaggaagattaagaaaaactg
 CGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCGCTTAAGaggaagattaagaaaaactg
 GCACACGGAGCTTGTGGCTCGCTGGGACGTCGCTGGGCGAATTctccttctaattcttttgac
 HSV TK promoter
 L 5'-UTR
 Hairpin L
 GGACGTCGCTGGGCGAATTctccttctaattcttttgac
 pFR+L_Vrev

pFR+L_Fwd
 cttattgggt
 attcttctcttgatattaaATGGAA
 cttattgggtctttccgtgttttagatgaagcagttgaaattcttctcttgatattaaATGGAA
 gaataaccagaaaggcacaaaatctacttcgtcaactttaagaaggagaactataattTACCTT
 L 5'-UTR
 Hairpin L
 tctgtaactttaagaaggagaactataattTACCTT
 pFR+L_Frev
 Met Glu
 firefly luciferase

pFR+L_Vfwd
 GACGCCAAAAACATAAAGAAAG
 GACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGA
 CTGCGGTTTTTGTATTTCTTCCGGCCGCGGTAAGATAGGCGACCTTCTACCTTGGCGACCTCT
 Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu
 firefly luciferase
 CTGCGGTTTTTGTATTT
 pFR+L_Frev

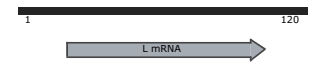
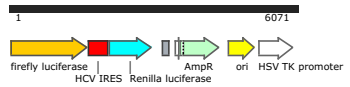
Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+L_Fwd	51-mer	740 .. 790		71°C
/sequence	= CCCTGCAGCGACCCGCTTAagaggaagattaagaaaaactgttattgggt			
	47% GC / 15.756,3 Da			
✓ pFR+L_Vrev	39-mer	741 .. 779		67°C
/sequence	= agtttttctaattctctCTAAGCGGGTCGCTGCAGG			
	46% GC / 11.945,8 Da			
✓ pFR+L_Frev	50-mer	810 .. 859		67°C
/sequence	= ATGTTTTTGCGCTCTCCATttaatatcaagaggaagaatttcaactgct			
	34% GC / 15.379,1 Da			
✓ pFR+L_Vfwd	48-mer	820 .. 867		64°C
/sequence	= attcttcctcttgatattaaATGGAAGACGCCAAAAACATAAGAAAG			
	31% GC / 14.783,8 Da			



**GIBSON
ASSEMBLY**

Insert between DNA ends
1 .. 6071

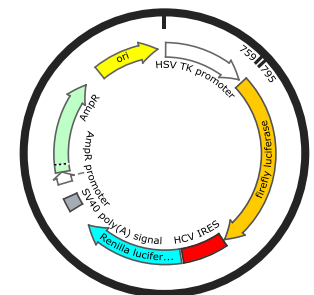
Overlap and insert
1 .. 120



Linearized Vector
6071 bp

PCR

Amplify 795 .. 759 using:
Vector.FOR
Vector.REV

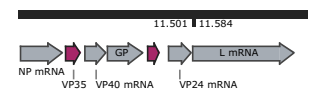


Dual-luc-IRES
6066 bp

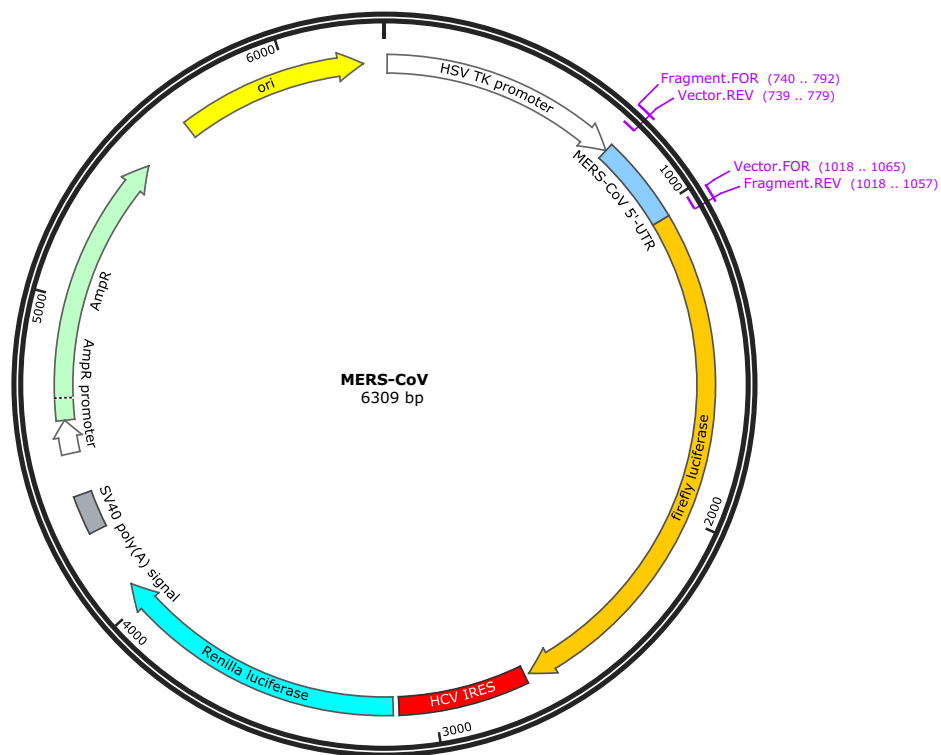
Fragment
120 bp

PCR

Amplify 11.501 .. 11.584 using:
Fragment.FOR
Fragment.REV



Ebola genom Zaire
18,959 bp



Fragment.FOR
CCCTGCAGCGACCCGCTTAAGattttaagtgaatagcttggc

5' CGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCCTGCAGCGACCCGCTTAAGattttaagtgaatagcttggc

3' GCACACCGGAGCTTGTGGCTCGCTGGGACGTCGCTGGGCGAATTtctaaattcacttatcgaaccg

HSV TK promoter

MERS-CoV 5'-UTR

Vector.REV
TGGGACGTCGCTGGGCGAATTtctaaattcacttatcgaacc

Fragment.FOR
tatctcactttcc

tatctcacttccccctcggttctcttgcagaactttgattttaacgaacttaataaaaagccctgtt

845 atagagtgaagggagcaagagaaacgtcttgaactaaaattgcttgaatttatctcgggacaa

MERS-CoV 5'-UTR

910 gtttagcgtatcgttgcaacttgtctggtgggattgtggcatttaattgacctcatctaggcag

caaatcgcatagcaacgtgaacagaccaccctaaccgtaattaaacggacgagtagatccgtc

MERS-CoV 5'-UTR

975 tggacatatgtcaacactgggtataatttctaattgaatactatcttccagtttagagcgtcgtgt

acctgtatacagattgtgacccatattaagatttaacttatgataaaaagtcactctgcagcaca

MERS-CoV 5'-UTR

Vector.FOR
gtggcaattcggggcacatcATG

ctcttgtagctctcggtcacaatacacggttctcggtcggtggcaattcggggcacatcATG

1040 gagaacatgcagagccagtgattatgtgccaagcaggccacgcaccgttaagcccgtagTAC

MERS-CoV 5'-UTR

1 Met

firefly luciferase

Fragment.REV
caccgttaagccccgtgtagTAC

Vector.FOR
GAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAG

GAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGG

3' CTTCTGCGGTTTTTGTATTTCTTTCCGGGCCGCGGTAAAGATAGGCGACCTTCTACCTTGGCGACC

5' 1105

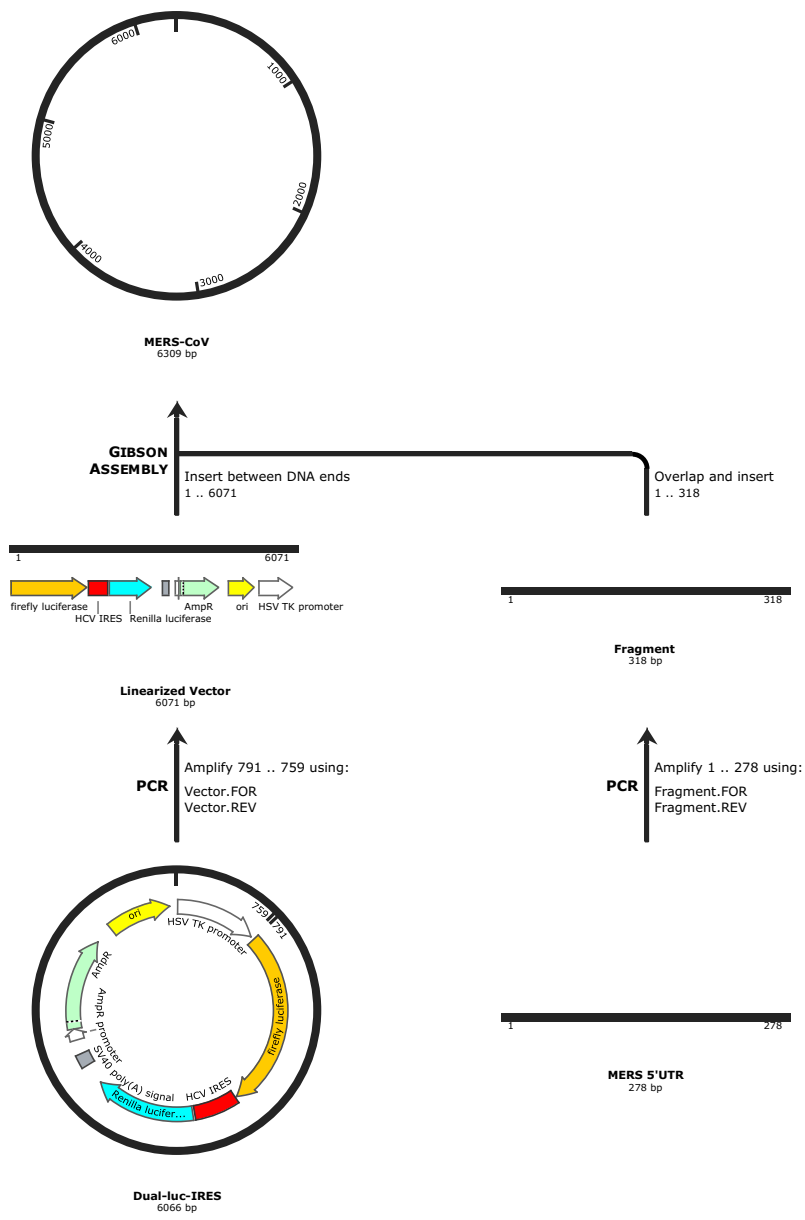
5 10 15 20

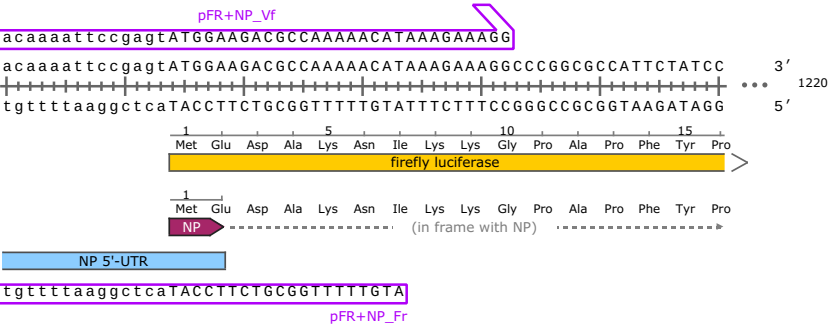
Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly



firefly luciferase

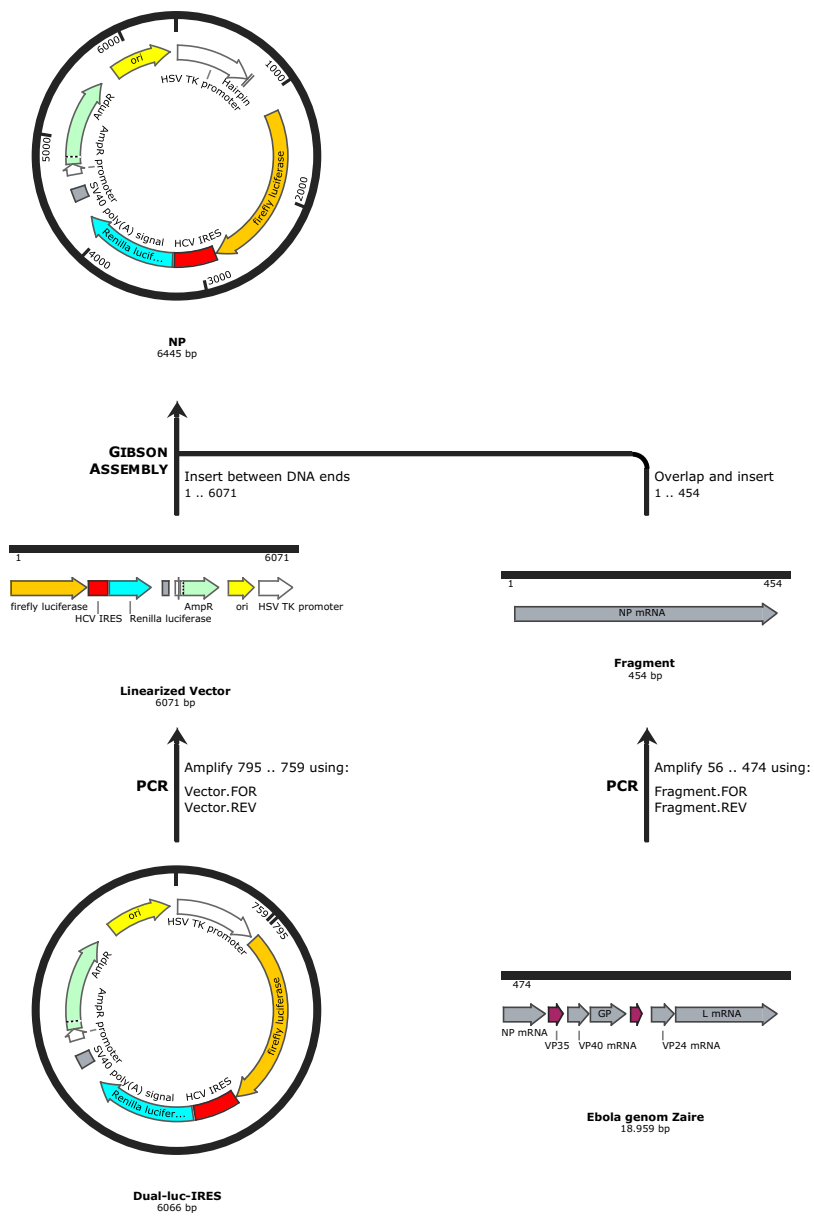
Fragment.REV
CTTCTGCGGTTTTTGTAT

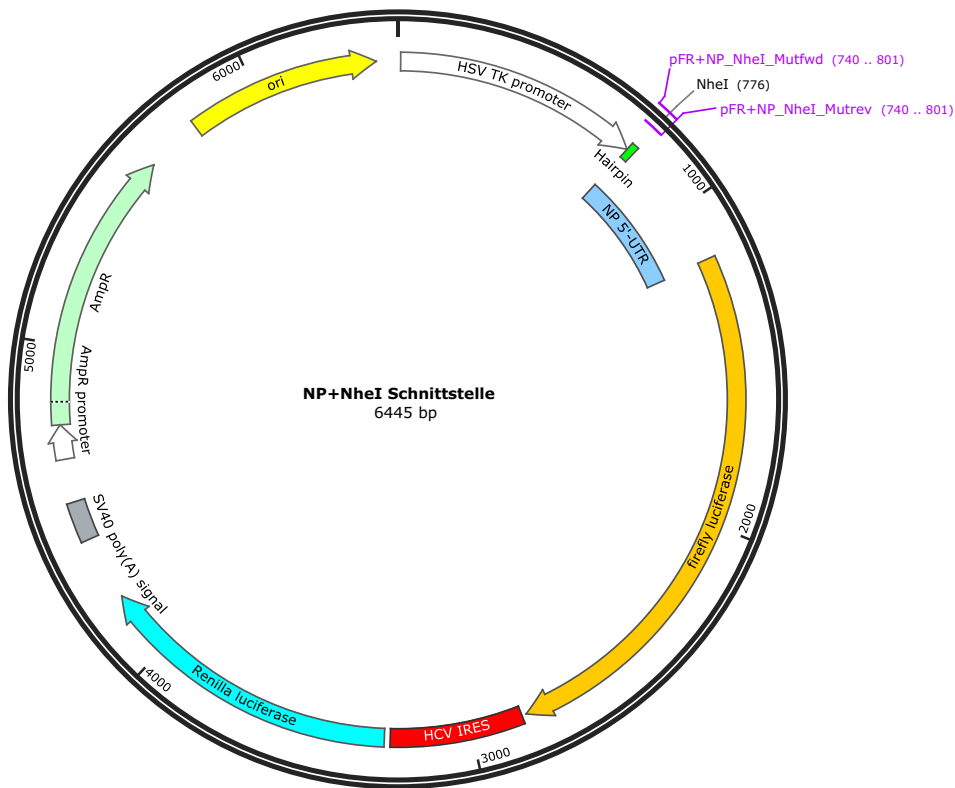
Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ Vector.REV	41-mer	739 .. 779	⇌	70°C
/sequence	= ccaagctattcacttaaatcTTAAGCGGGTCGCTGCAGGGT			
	49% GC / 12.600,2 Da			
✓ Fragment.FOR	53-mer	740 .. 792	➡	71°C
/sequence	= CCCTGCAGCGACCCGCTTAAgatttaagtgaatagcttggtatctcacttcc			
	49% GC / 16.178,5 Da			
✓ Vector.FOR	48-mer	1018 .. 1065	➡	70°C
/sequence	= gtggcaattcggggcacatcATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAG			
	46% GC / 14.909,8 Da			
✓ Fragment.REV	40-mer	1018 .. 1057	➡	71°C
/sequence	= ATGTTTTGGCGTCTTCCATgatgtgccccgaattgccac			
	50% GC / 12.220,0 Da			





Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+NP_Ff	62-mer	740 .. 801		69°C
/sequence	= CCCTGCAGCGACCCGCTTAagaggaagattaataatttcctctcattgaaatttatatcgg			
	40% GC / 19.025,5 Da			
✓ pFR+NP_Vr	39-mer	741 .. 779		65°C
/sequence	= gaaaattattaatcttctcTTAAGCGGGTCGCTGCAGG			
	44% GC / 11.996,9 Da			
✓ pFR+NP_Fr	43-mer	1151 .. 1193		68°C
/sequence	= ATGTTTTTGGCGTCTTCCATactcggaattttgtgattccgag			
	42% GC / 13.211,6 Da			
✓ pFR+NP_Vf	49-mer	1154 .. 1202		66°C
/sequence	= ggaatcacaaaattccgagtATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGG			
	39% GC / 15.215,0 Da			





NheI

pFR+NP_NheI_Mutfwd

5' ... CGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGAccctgcagcgacccgcttaagaggaagatttaattaagctag

3' ... GCACACGGAGCTTGTGGCTCGCTgggacgtcgctgggcgaattctccttctaatttaattcgatc

HSV TK promoter

NP 5'-UTR

Hairpin

pFR+NP_NheI_Mutrev

pFR+NP_NheI_Mutfwd

cctcattgaaatttatatcgg

cctcattgaaatttatatcgggaatttaaattgaaattgttactgtaatcacacctggtttgtttc

ggagtaactttaaatatagccttaaatttaactttaacaatgacattagtgtggaccaacaag

NP 5'-UTR

Hairpin

ggagtaactttaaatatagcc

pFR+NP_NheI_Mutrev

agagccacatcacaaagatagagaacaacctaggtctccgaaggagcaagggtcatcagttgtgct

tctcggtgtagtgtttctatctcttgttgatccagaggcttcctcgttcccgtagtcacacga

NP 5'-UTR

cagttgaaaatcccttgtcaacaccttaggtcttatcacatcacaaagttccacctcagactctgca

gtcaacttttagggaacagttgtggatccagaatagtgtagtgttcaagggtggagctcgagacgt

NP 5'-UTR

gggtgatccaacaaccttaatagaacattattgttaaaggacagcattagtgtcacagtcacaaca

cccactaggttgttggaattatcttgttaataacaatttcctgtcgtaatcaagtgctcagttgt

NP 5'-UTR

agcaagattgagaattaaccttggttttgaacttgaacaccttaggggattgaagattcaacaacc

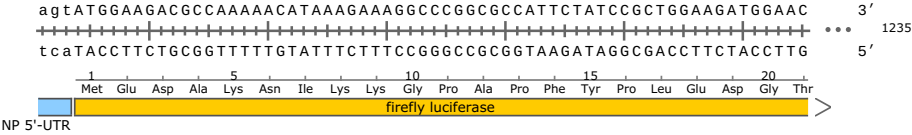
tcgttctaactcttaattggaacaaaacttgaacttgtgaatcccttaacttctaagttgttgg

NP 5'-UTR

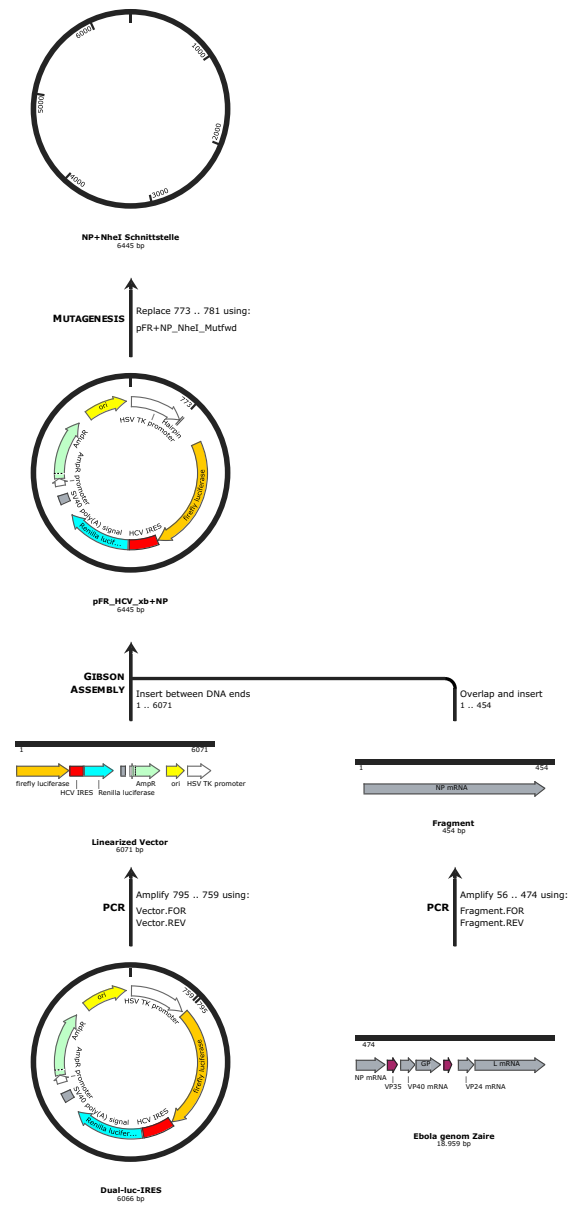
ctaaagcttggggtaaaacatttgaaatagttaaagacaaattgtctcggaatcacaaaaattccg

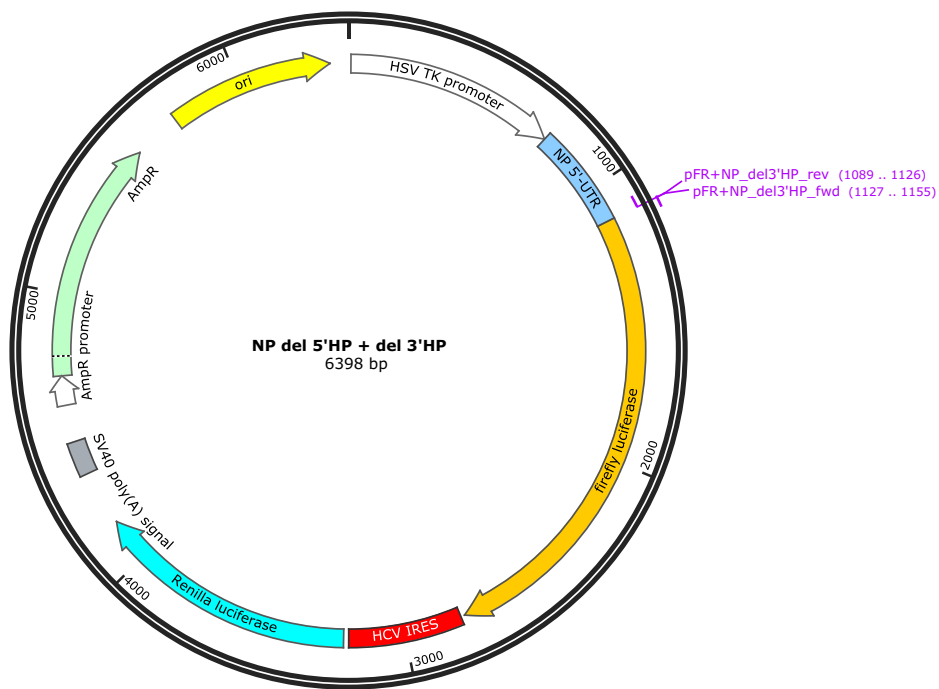
gatttcgaacccattttgtaacctttatcaatttctgtttaacgagccttagtgttttaaggc

NP 5'-UTR



Primer	Length	Binding Sites		Tm
<p>✓ pFR+NP_NheI_Mutfwd</p> <p>/sequence = cctgcagcgaccgccttaagaggaagattaattaagctagcctcattgaaatttatatcgg</p> <p>44% GC / 19.084,5 Da</p>	62-mer	740 .. 801		70°C
<p>✓ pFR+NP_NheI_Mutrev</p> <p>/sequence = ccgataaaattcaatgaggctagcttaattaatcttctcttaagcgggcgctgcaggg</p> <p>44% GC / 19.097,5 Da</p>	62-mer	740 .. 801		71°C





5' CGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCTGCAAGCGACCCGCTTAAtcattgaaatttatatcgga
...
3' GCACACGGGAGCTTGTGGCTCGCTGGGACGTCGCTGGGCGAATTtagtaactttaatatagcctt

HSV TK promoter NP 5'-UTR

tttaaatgaaattgttactgtaatcacacctggtttgtttcagagccacatcacaaagatagag
...
aaatttaactttaacaatgacatttagtgggaccaaacaagtcctcgggtgtaggtttctatctc

NP 5'-UTR

aacaacctagggtctccgaaggagcaaggccatcagtggtcagttgaaatcccttgtaaca
...
ttgttggatccagaggttccctcgttcccgtagtcacacgagtcacttttagggaacagttgt

NP 5'-UTR

cctagggtcttatcacatcacaaagttccacctcagactctgcagggtgatccaacaaccttaatag
...
ggatccagaatagtgtagtgttcaagggtggagctctgagacgtccactaggtgttggaaattatc

NP 5'-UTR

aaacattattgttaaaggacagcatttagttcacagtcaacaagcaagattgagaattaaccttg
...
tttgaataacaatttctgtcgttaatacagtgtagttgttgcgttctaactcttaattggaac

NP 5'-UTR

gttttgaacttgaacacttaggggattgaagattcaacaacctaaagcttggggtaaacattg
...
caaaacttgaacttgaatccctaacttctaagttgttgggatttcgaacccattttgtaac

NP 5'-UTR

gaacccattttgtaac
pFR+NP_del3'HP_rev




pFR+NP_del3'HP_fwd
ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGG

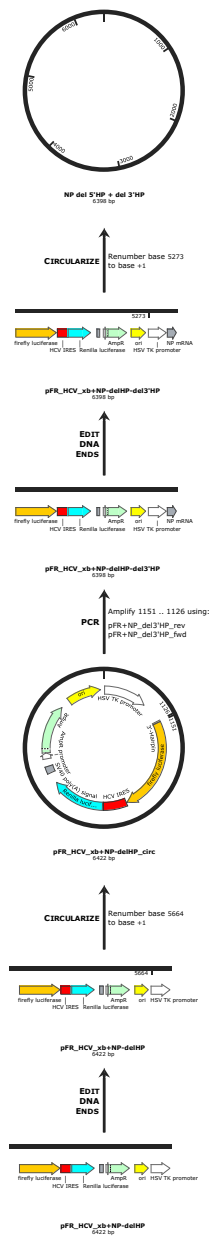
gaaatagttaaagacaaattATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCGCGCCATTCTA
...
ctttatcaattttctgttttaTACCTTCTGCGGTTTTTGTATTCTTTCCGGGCCGCGGTAAGAT

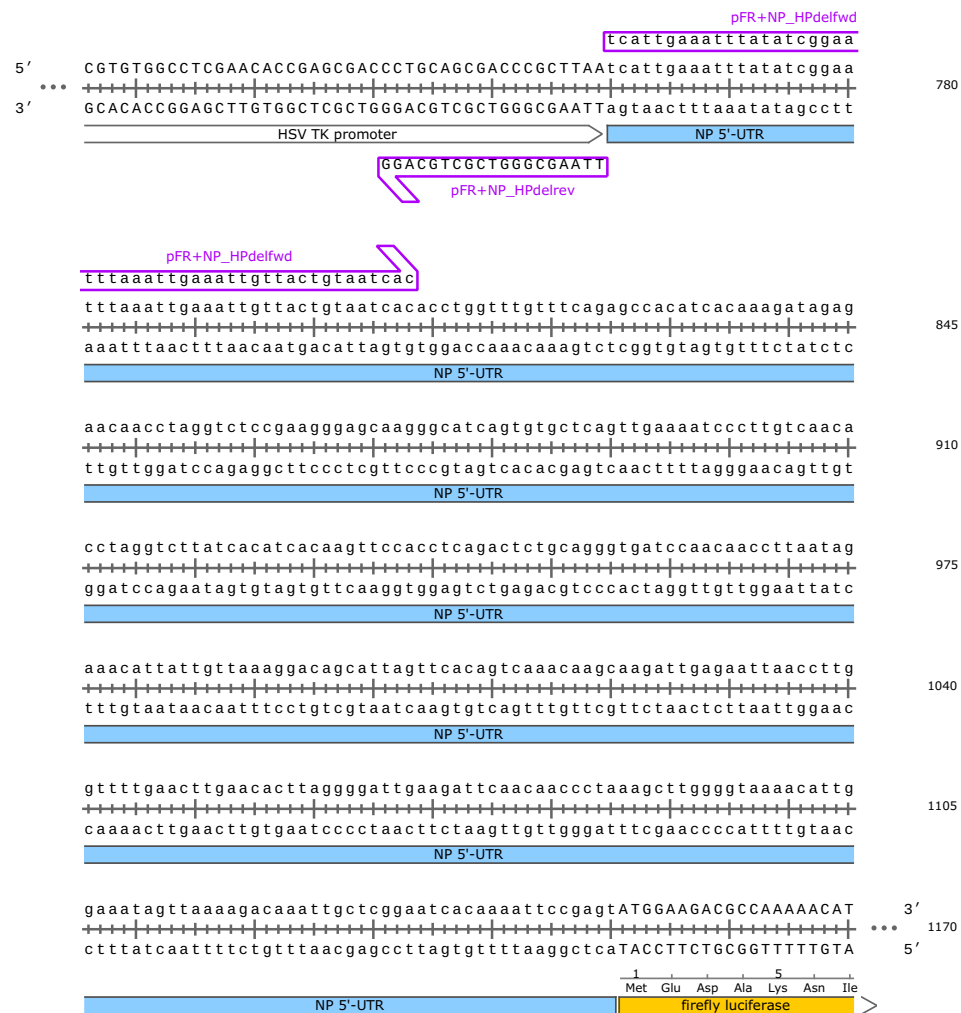
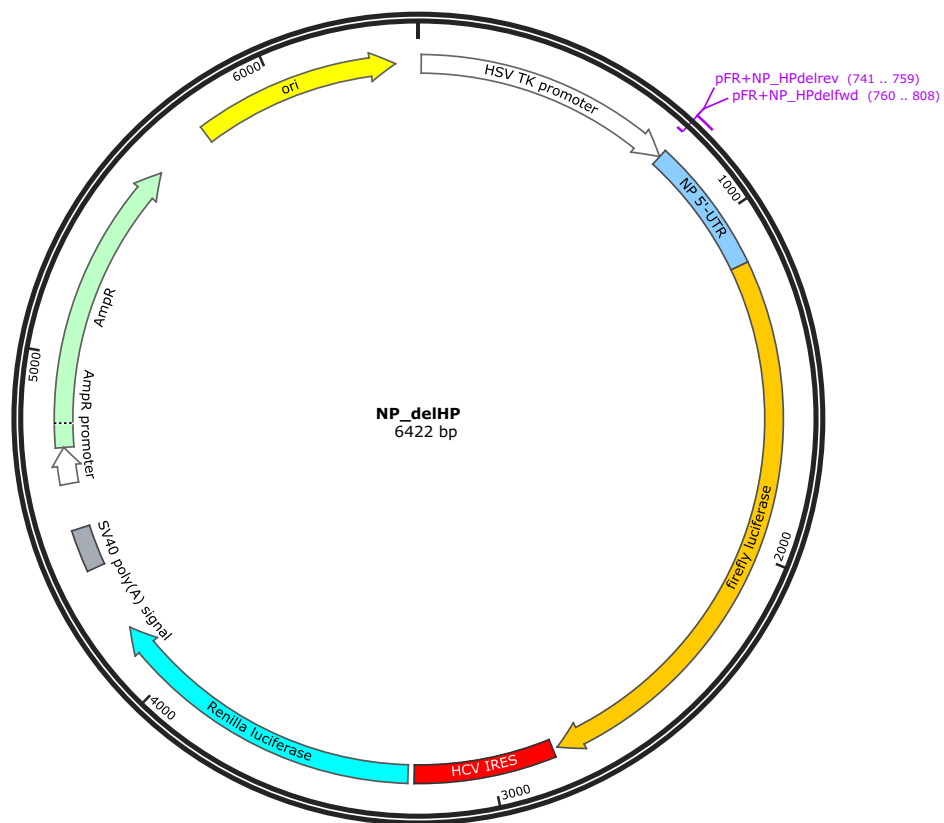
NP 5'-UTR firefly luciferase

ctttatcaattttctgtttaa
pFR+NP_del3'HP_rev

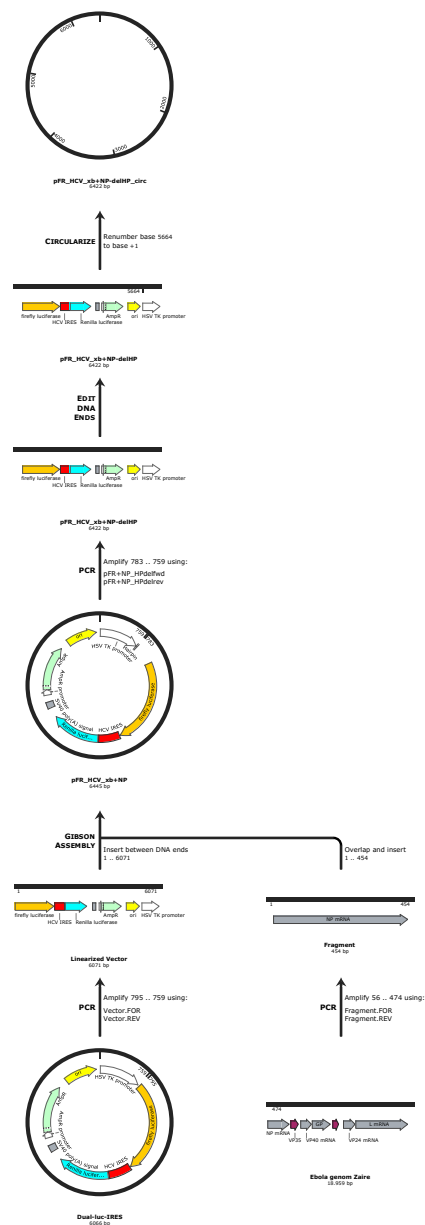
1 Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr

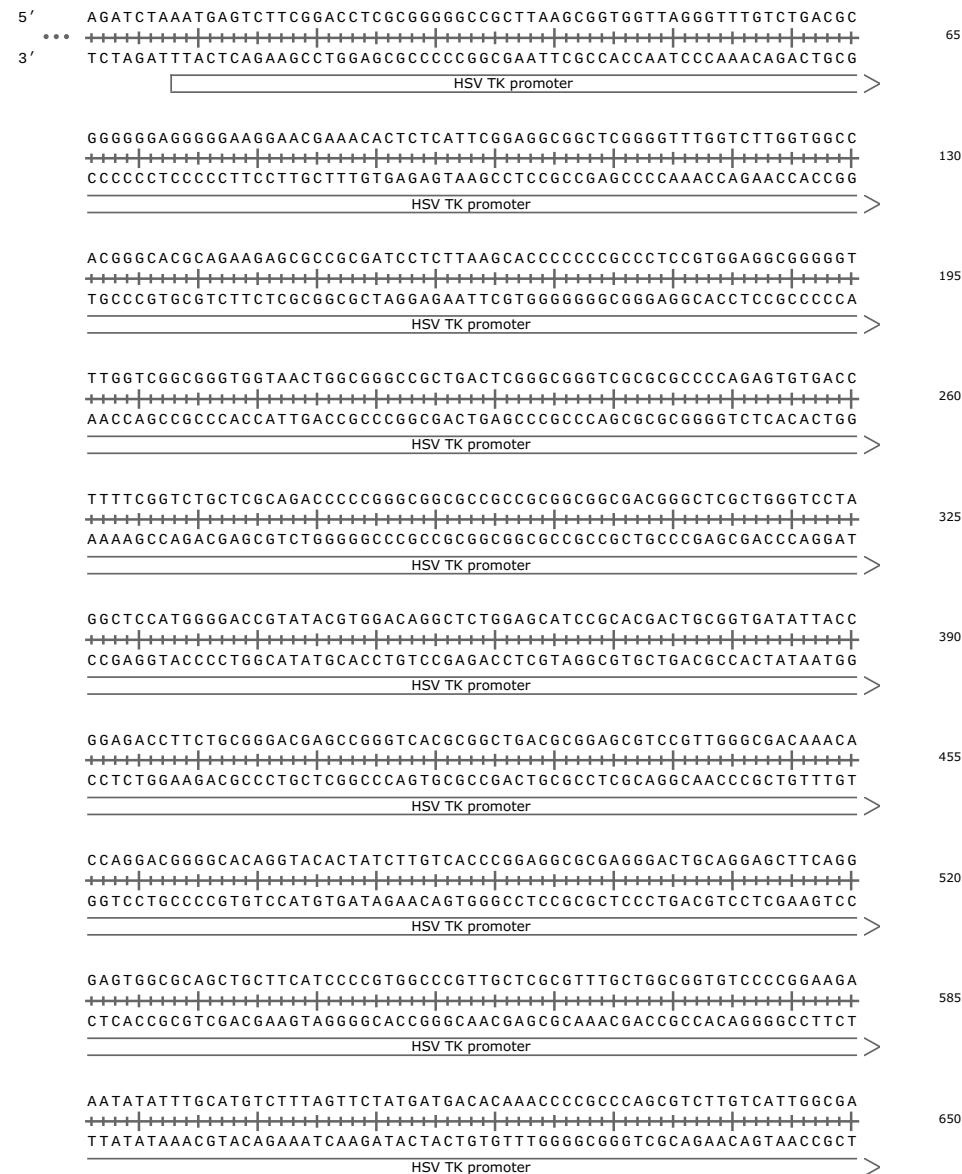
Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+NP_del3'HP_rev	38-mer	1089 .. 1126		60°C
/sequence = aatttgcttttaactatttccaatgtttaccccaag				
29% GC / 11.542,6 Da				
✓ pFR+NP_del3'HP_fwd	29-mer	1127 .. 1155		60°C
/sequence = ATGGAAGACGCCAAAACATAAGAAAGG				
38% GC / 9019,0 Da				

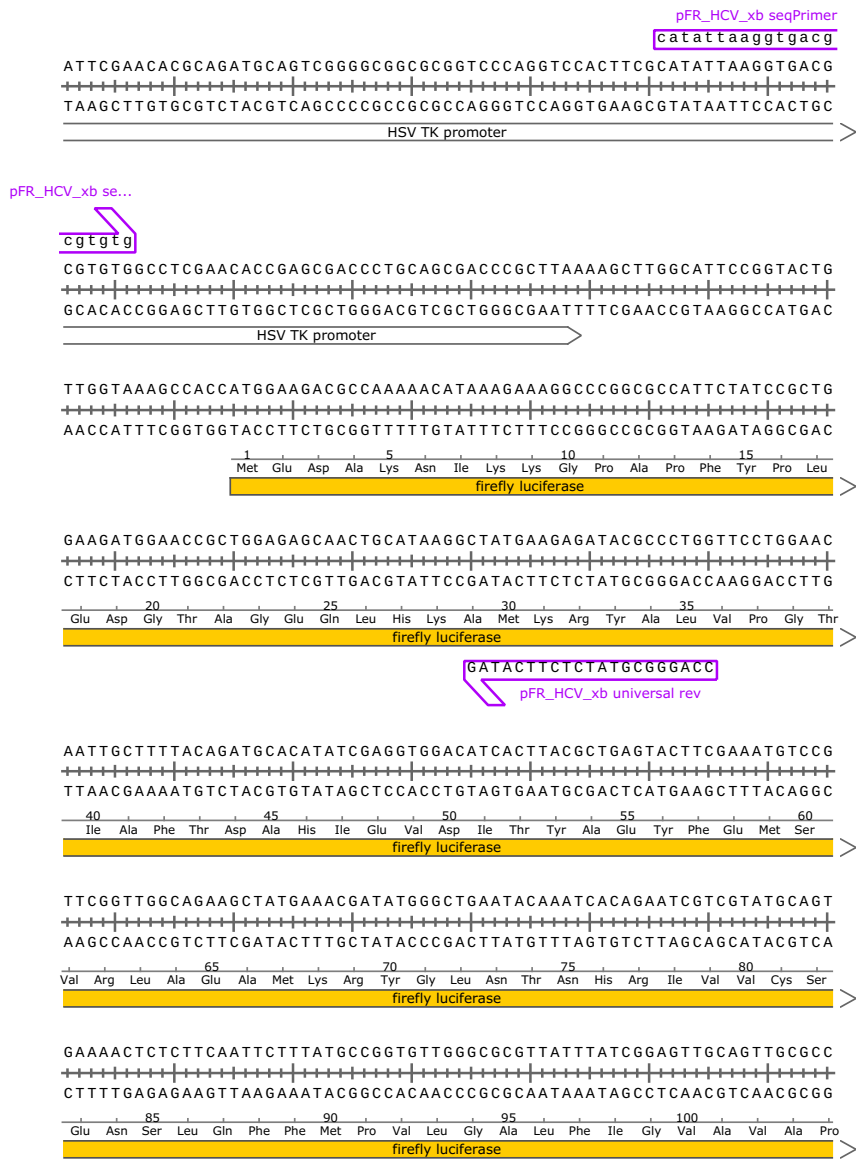




Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+NP_HPdelrev	19-mer	741 .. 759	↵	60°C
/sequence	= TTAAGCGGGTCGCTGCAGG 63% GC / 5884,9 Da			
✓ pFR+NP_HPdefwd	49-mer	760 .. 808	➤	59°C
/sequence	= tcattgaaatttatcgcgaatttaattgaaattgttactgtaatcac 22% GC / 15.081,0 Da			







caggattacaagattcaaagtgcgctgctggtgccaacccctattctccttcttcgccaaaagcac
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
gtcctaagtgttctaagtttcacgcgcacgaccacggttgggataagaggaagaagcggttttcggtg
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
280 285 290 295
Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Val Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr
firefly luciferase

tctgattgacaaatacgatttatctaatttacacgaaattgcttctggtggcgctccctctctta
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
agactaaactgtttatgctaataatagattaaatgtgctttaacgaagaccacgcgaggggagagat
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
300 305 310 315 320
Leu Ile Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser
firefly luciferase

aggaagtcggggaagcggttgccaagaggttccatctgccaggtatcaggcaaggatatgggctc
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
tccttcagcccttcccaacggttctccaaggtagacggtccatagtccgttctctatacccgag
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
325 330 335 340
Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile Arg Gln Gly Tyr Glu Leu
firefly luciferase

actgagactacatcagctatttctgattacaccgaggggatgataaacgggcgcggtcggttaa
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
tgactctgagtgtagtgcataagactaatgtgggtcccccctactatttggcccgccagccatt
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
345 350 355 360 365
Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys
firefly luciferase

agttgttccatttttgaagcgaaggttggatctggataccgggaaaaacgctggcggttaatc
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
tcaacaaggtaaaaaacttcgcttccaacacctagacctatggcccttttgcgacccgcaattag
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
365 370 375 380 385
Val Val Pro Phe Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val Asn
firefly luciferase

aaagaggcgaactgtgtgtgagaggtcctatgattatgtccggttatgtaacaatccggaagcg
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
tttctccgcttgacacacactctccaggatactaatacaggccaatacatcttgttaggccttcgc
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
390 395 400 405
Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala
firefly luciferase

accaacgccttgattgacaaggatggatggctacattctggagacatagcttactgggacgaaga
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
tggttgcggaactaactgttccctacctaccgatgtaagacctctgtatcgatgacctgcttct
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
410 415 420 425
Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp
firefly luciferase

cgaacacttcttcacgttgaccgcctgaagtctctgattaagtacaaaggctatcaggtggctc
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
gcttgtgaagaagtagcaactggcggacttcagagactaattcatgtttccgatagtccaccgag
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
430 435 440 445 450
Glu His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val Ala
firefly luciferase

ccgctgaattggaatccatcttgcctcaaacaccccaacatcttcgacgcaggtgtcgcaggcttt
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ggcgacttaaccttaggtagaacgaggttgtggggttgtagaagctgcgtccacagcgtccagaa
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
455 460 465 470
Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu
firefly luciferase

cccgacgatgacgccggtgaaacttcccgccgcggttgtgttttggagcacggaaagacgatgac
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
gggctgctactgcggccacttgaaggcgccggcaacaacaaaacctcgtgcctttctgctactg
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
475 480 485 490
Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu Pro Ala Ala Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr
firefly luciferase

ggaaaaagagatcgtggattacgtgccagtcagtaacaaccgcgaaaaagtgtgcggaggag
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ccttttctctagcacctaatgcagcggtcagttcatgttggcgctttttcaacgcgcctcctc
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
495 500 505 510 515
Glu Lys Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu Arg Gly Gly
firefly luciferase

TTGtGTTTGTGGAcGAaGTaCCGAAAGGTCTTACCgGAAAACTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAcAcAAACACCTGCTtCATGGCTTTCcAGAATGGCCTTTGAAGCTGCGTCTTTTTAGTCTCTC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
520 525 530 535
Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu
firefly luciferase

ATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGAAAGATCGCCGTGTAATTCTAGTGTACGTAGCCAGCCCC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGGAGTATTTCCGGTTCTTCCCGCCTTTCTAGCGGCACATTAAGATCACATGCATCGGTCGGGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
540 545 550
Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys Gly Gly Lys Ile Ala Val
firefly luciferase

HCV IRES

CGATTGGGGGGACACTCCACCATAGATCACTCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCTAACCCCGCTGTGAGGTGGTATCTAGTGAGGGGACACTCCTTGATGACAGAAGTGCCTCTTT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
HCV IRES

GCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGAGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGCAGATCGGTACCGCAATCACTCTCAGCACGTGCGAGGTCCTGGGGGGGAGGGCCCTCTCGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
HCV IRES

ATAGTGGTCTGCGGAACGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGAATC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TATCACCAGACGCTTGGCCACTCATGTGGCCTTAACGGTCCTGCTGCCCCAGGAAAAGAACCTAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
HCV IRES

AACCCGCTCAATGCCTGGAAGATTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGGGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGACACGGGGCGTTCTGACGATCGGCTCATCAACCCA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
HCV IRES

CGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCAGAGTGCCCGGGAGGTTCTCGTAGACC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCGCTTTCGGAACACCATGACGGACTATCCACGAACGCTCACGGGGCCCTCCAGAGCATCTGG

HCV IRES

GTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACAAACGTAACACCAACCGCCGCCAC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACGTGGTACTCGTGCTTAGGATTGGAGTTTCTTTTGGTTTGCAATTGTGGTTGGCGGCGGGTG

HCV IRES

AGGACGTCTTCATATGTCTAGCCACCATGACTTCGAAAGTTTATGATCCAGAACAAAGGAAACGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCCTGCAGAAGTATACAGATCGGTGGTACTGAAGCTTTCAAATACTAGGTTCTGTTCCTTTGCC

HCV IRES

1 5 10
Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg
Renilla luciferase

ATGATAACTGGTCCGCGAGTGGTGGGCCAGATGTAACAAATGAATGTTCTTGATTCAATTTATTAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACTATTGACCAGGCGTCACCACCGGTCTACATTTGTTTACTTACAAGAACTAAGTAAATAATT

15 20 25 30 35
Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn
Renilla luciferase

TTATTATGATTGAGAAAAACATGCAGAAAATGCTGTTATTTTTTACATGGTAACGCGGCCTCTT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATAATACTAAGTCTTTTTGTACGTCTTTTACGACAATAAAAAATGTACCATTGCGCCGGAGAA

40 45 50 55
Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser
Renilla luciferase

CTTATTTATGGCGACATGTTGTGCCACATATTGAGCCAGTAGCGGGTGATTATACCAGACCTT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAATAAATACCCTGTACAACACGGGTATAACTCGGTCACTCGGCCACATAAATATGCTCTGGAA

60 65 70 75
Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu
Renilla luciferase

ATTGGTATGGGCAAAATCAGGCAAACTCTGGTAATGGTTCTTATAGGTTACTTGATCATTACAAATA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAACCATACCCGTTTAGTCCGTTTAGACCATTACCAAGAATATCCAATGAAGTGTATGTTTAT

80 85 90 95 100
Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr
Renilla luciferase

TCTTACTGCATGGTTTGAACCTCTTAATTTACCAAGAAGATCATTTTTGTGCGCCATGATTGGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGAATGAGCTACCAAACCTGAAGAATTAATGGTTTCTTCTAGTAAAAACAGCCGGTACTAACC

105 110 115 120
Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp
Renilla luciferase

GTGCTTGTTTGGCATTTCATTATAGCTATGAGCATCAAGATAAGATCAAAGCAATAGTTCACGCT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACGAACAAACCGTAAAGTAATATCGATACTCGTAGTTCTATTCTAGTTTCGTTATCAAGTGCGA

125 130 135 140
Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Ser Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala
Renilla luciferase

GAAAGTGTAGTAGATGTGATTGAATCATGGGATGAATGGCCTGATATTGAAGAAGATATTGCGTT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTTTCACATCATCTACACTAACTTAGTACCCTACTTACGGGACTATAACTTCTTCTATAACGCAA

145 150 155 160 165
Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu
Renilla luciferase

GATCAAATCTGAAGAAGGAGAAAAAATGGTTTTGGAGAATAACTTCTTCGTGGAACCATGTTGC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAGTTTAGACTTCTTCTCTTTTTTACCAAAACCTCTTATTGAAGAAGCACCTTGGTACAACG

170 175 180 185
Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Met Leu
Renilla luciferase

CATCAAAAATCATGAGAAAGTTAGAACCAGAAGAATTTGCAGCATATCTTGAACCATTCAAAGAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTAGTTTTTAGTACTCTTTCAATCTTGGTCTTCTTAAACGTCGTATAGAACTTGGTAAGTTTCTC

190 195 200 205
Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Thr Met Lys Glu
Renilla luciferase

AAAGGTGAAGTTTCGTCGTCCAACATTATCATGGCCTCGTGAATCCCGTTAGTAAAAGGTGGTAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTCCACTTCAAGCAGCAGGTGTAATAGTACCGGAGCACTTTAGGGCAATCATTITCCACCATT

210 215 220 225 230
Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys
Renilla luciferase

ACCTGACGTTGTACAAATTGTTAGGAATTATAATGCTTATCTACGTGCAAGTGATGATTTACCAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGACTGCAACATGTTTAAACATCCTTAATATTACGAATAGATGCACGTTCACTACTAAATGGTT

235 240 245 250
Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro
Renilla luciferase

AAATGTTTATTGAATCGGACCCAGGATTCCTTTCCAATGCTATTGTTGAAGGTGCCAAGAAGTTT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTCAAAATAACTTAGCCTGGGTCTAAGAAAAGGTTACGATAACAACTTCCACGGTTCTTCAAA

255 260 265 270
Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe
Renilla luciferase

CCTAATACTGAATTTGTCAAAGTAAAAGGCTTTCATTTTTCGCAAGAAGATGCACCTGATGAAAT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGATTATGACTTAAACAGTTTCATTTCCAGAAGTAAAAGCGTTCTTCTACGTGGACTACTTTA

275 280 285 290 295
Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met
Renilla luciferase

GGGAAAATATATCAAATCGTTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATGAACAATAATTCTAGACTCGAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCTTTTATATAGTTTAGCAAGCAACTCGCTCAAGAGTTTCTTACTGTATTAAAGATCTGAGCTC

300 305 310
Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
Renilla luciferase

C CGGAAGTTTTACAAAGCTAACACCGGAAGTTTTACAAAGCTAACACCGGAAGTTTTACAAAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCCTTCAAAAGTGTTCGATTGTGGCCTTCAAAAGTGTTCGATTGTGGCCTTCAAAAGTGT

3380

3445

3510

3575

3640

3705

3770

3835

3900

GCTAACACCGGAAGTTTTTCACAAAGCTAACACCGGAGTTTTTCACAAAGCTAACACCGGAAGTTTT
CGATTGTGGCCTTCAAAAGTGTTCGATTGTGGCCTCAAAAGTGTTCGATTGTGGCCTTCAAAA

CACAAAGCTAACACCGGATCGCGGGCCCTAGAGCGGCCGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACAT
GTGTTTCGATTGTGGCCTAGCGCCCGGGaTCTCGCCGGCGAAAGCTCGTCTGACTATTCTATGTA

SV40 poly(A) signal

TGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTG
ACTACTCAAAACCTGTTTGGTGTGATCTTACGTCACTTTTTTACGAAATAAACACTTTTAAACAC

SV40 poly(A) signal

ATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATT
TACGATAACGAAATAAACATTGGTAATATTCGACGTTATTTGTTCAATTGTTGTTGTTAACGTAA

SV40 poly(A) signal

CATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAA
GTAAATACAAAGTCCAAGTCCCCCTCCACACCCTCCAAAAAATTTGCTTCATTTTGGAGATGTT

ATGTGGTAAATCGATAAGGATCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTT
TACACCATTTTAGCTATTCTAGGTCCACCGTGAAAAGCCCTTTACACGCGCCTTGGGGATAAA

AmpR promoter

GTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTT
CAAATAAAAGATTTATGTAAGTTTATACATAGGCGAGTACTCTGTTATTGGGACTATTTACGAA

AmpR promoter

CAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTT
GTTATTATAACTTTTTCTTCTCATACTCATAAGTTGTAAAGGCACAGCGGGAATAAGGGAAAAA

AmpR promoter

signal sequence

AmpR

TGCGGCATTTTGCCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAAG
ACGCCGTAAACGGAAGACAAAACGAGTGGGTCTTTGCGACCACTTTCATTTCTACGACTTTC

signal sequence

AmpR

ATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGT
TAGTCAACCCACGTGCTCACCAATGTAGCTTGACCTAGAGTTGTCGCCATTCTAGGAACTCTCA

Asp Gln Leu Gly Ala Arg Val Gly Tyr Ile Glu Leu Asp Leu Asn Ser Gly Lys Ile Leu Glu Ser

AmpR

TTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATT
AAAGCGGGGCTTCTTGCAAAAGGTTACTACTCGTGAAAATTTCAAGACGATACACGCGCCATAA

Phe Arg Pro Glu Glu Arg Phe Pro Met Met Ser Thr Phe Lys Val Leu Leu Cys Gly Ala Val Leu
AmpR

ATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGG
TAGGGCATAACTCGGCCCGTTCTCGTTGAGCCAGCGGCGTATGTGATAAGAGTCTTACTGAACC

Ser Arg Ile Asp Ala Gly Gln Glu Gln Leu Gly Arg Arg Ile His Tyr Ser Gln Asn Asp Leu
AmpR

TTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGT
AACTCATGAGTGGTCAGTGCTTTTTCGTAGAATGCCTACCGTACTGTCACTTCTTAAATACGTCA

Val Glu Tyr Ser Pro Val Thr Glu Lys His Leu Thr Asp Gly Met Thr Val Arg Glu Leu Cys Ser
AmpR

GCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAECTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAA
CGACGGTATTGGTACTCAGTATTGTGACGCCGGTTGAATGAAGACTGTTGCTAGCCTCCTGGCTT

Ala Ala Ile Thr Met Ser Asp Asn Thr Ala Ala Asn Leu Leu Thr Thr Ile Gly Gly Pro Lys
AmpR

GGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTGCCTTGATCGTTGGGAACCGG
CCTCGATTGGCGAAAAACGTGTTGTACCCCTAGTACATTGAGCGGAAGTACCAACCTTGCGC

Glu Leu Thr Ala Phe Leu His Asn Met Gly Asp His Val Thr Arg Leu Asp Arg Trp Glu Pro
AmpR

AGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACG
TCGACTTACTTCGGTATGGTTTGCTGCTCGCACTGTGGTGCTACGGACATCGTTACCGTTGTTGC

Glu Leu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Asp Glu Arg Asp Thr Thr Met Pro Val Ala Met Ala Thr Thr
AmpR

TTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGAT
AACGCGTTTGATAATTGACCGCTTGATGAATGAGATCGAAGGGCGGTGTTAATTATCTGACCTA

Leu Arg Lys Leu Leu Thr Gly Glu Leu Leu Thr Leu Ala Ser Arg Gln Gln Leu Ile Asp Trp Met
AmpR

4550

4615

4680

4745

4810

4875

4940

5005

GGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTTATTGCTG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCCGCTATTTCAACGTCCTGGTGAAGACGCGAGCCGGGAAGGCCGACCGACCAATAACGAC
210 215 220 225 230
Glu Ala Asp Lys Val Ala Gly Pro Leu Leu Arg Ser Ala Leu Pro Ala Gly Trp Phe Ile Ala

AmpR

ATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TATTTAGACCTCGGCCACTCGCACCAGAGCGCCATAGTAACGTCGTGACCCCGGTCTACCATTCT
235 240 245 250
Asp Lys Ser Gly Ala Gly Glu Arg Gly Ser Arg Gly Ile Ile Ala Ala Leu Gly Pro Asp Gly Lys

AmpR

CCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCCAACTATGGATGAACGAAATAGACA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGGAGGGCATAGCATCAATAGATGTGCTGCCCTCAGTCCGTTGATACCTACTTGTCTTATCTGT
255 260 265 270
Pro Ser Arg Ile Val Val Ile Tyr Thr Thr Gly Ser Gln Ala Thr Met Asp Glu Arg Asn Arg Gln

AmpR

GATCGCTGAGATAGGTCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAGCGACTCTATCCACGGAAGTGAATAATTCGTAACCATTTGACAGTCTGGTTCAAATGAGTATAT
275 280 285
Ile Ala Glu Ile Gly Ala Ser Leu Ile Lys His Trp

AmpR

TACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGAT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGAAATCTAACTAAATTTTGAAGTAAAAATTAATTTTCCTAGATCCACTTCTAGGAAAAACTA

AATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTAGAGTACTGGTTTTAGGGAATTGCACTCAAAGCAAGGTGACTCGCAGTCTGGGGCATCTTTT

GATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAAC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAGTTTCTAGAAAGAACTCTAGGAAAAAAGACGCGCATTAGACGACGAACGTTTGTTTTTTTG

ori

CACCGCTACCAAGCGGTGGTTTGGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTGGCGATGGTCGCCACCAACAAACGGCCTAGTTCTCGATGGTTGAGAAAAAGGCTTCCATTGA

ori

GGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCGAAGTCGTCTCGCGTCTATGTTTTATGACAAGAAGATCACATCGGCATCAATCCGGTGTTGAA

ori

5070

CAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTTCTTGAGACATCGTGGCGGATGTATGGAGCGAGACGATTAGGACAATGGTCACCGACGACGGT

ori

5655

GTGGCGATAAGTCGTGTCTTACC6GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACCGCTATTCAGCACAGAATGGCCCAACCTGAAGTTCTGCTATCAATGGCCTATTCCGCGTCGCC

ori

5720

TCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGCCCGACTTGCCCCCAAGCACGTGTGTGCGGGTCGAACCTCGCTTGCTGGATGTGGCTTGACTC

ori

5785

ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGCGGACAGGTATC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TATGGATGTCGCACTCGATACTCTTTCGCGGTGCGAAGGGCTTCCCTCTTTCGCGCTGTCCATAG

ori

5850

CGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCCTGGTAT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCCATTGCGCGTCCCAGCCTTGTCTCTGCGTGCTCCCTCGAAGGTCGCCCTTTCGCGACCATATA

ori

5915

CTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAAATATCAGGACAGCCCAAAGCGGTGGAGACTGAACTCGCAGCTAAAAACACTACGAGCAGTCC

ori

5980

GGGGCGGAGCCTATGAAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCCGCTCGGATACCTTTTTCGCGTCTGTCGCCGGAATAATGCCAAGGACGGGAAAAACGACCG




ori

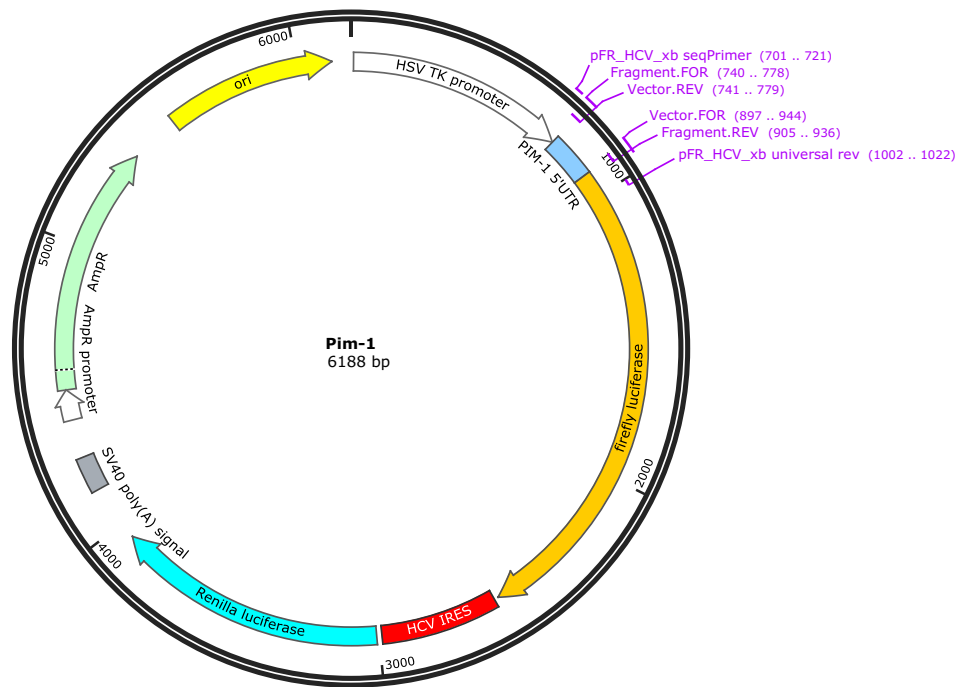
6045

CTTTTGCTCACATGGCTCGAC 3'
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAAAACGAGTGTACCGAGCTG 5' 6066

5525

5590

Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR_HCV_xb seqPrimer	21-mer	701 .. 721		56°C
/sequence = catattaagggtgacgcgtgtg				
48% GC / 6501,3 Da				
✓ pFR_HCV_xb universal rev	21-mer	880 .. 900		56°C
/sequence = CCAGGGCGTATCTTCATAG				
52% GC / 6397,2 Da				



Fragment.FOR
CCCTGCAGCGACCCGCTTAAccctttactcctggctgcg

5' CACCGAGCGACCCCTGCAGCGACCCGCTTAAccctttactcctggctgcggg

3' GTGGCTCGCTGGGACGTCGCTGGGCGAATTgggaaatgaggaccgacgcc

HSV TK promoter

PIM-1 5'UTR

GGACGTCGCTGGGCGAATTgggaaatgaggaccgacgcc

Vector.REV

gcgagccgggctctctgctgcagcggccggtggctgaggaggcccgagaggagtcggtggcagc

cgctcggccgcagacgacgtcgccggcgccaccgactcctcgggctctcctcagccaccgtcg

PIM-1 5'UTR

Vector.FOR
tagcctcctgccc

ggcggcgccgggaccggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcaaccactagcctcctgcccc

cgccgcgcgcctggccgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgttggatcgaggacgggg

PIM-1 5'UTR

acgggg

Fragment.REV

Vector.FOR
gcggcgATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAG

gcggcgATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCGCCATTCTATCCGCTGGGAAGATGG

cgccgcTACCTTCTGCGGTTTTTGTATTTCTTTCCGGGCCGCGGTAAGATAGGCGACCTTCTACC

Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro Leu Glu Asp Gly

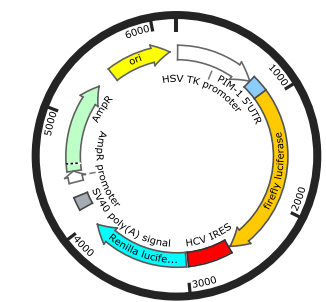
PIM-1 5'UTR

firefly luciferase

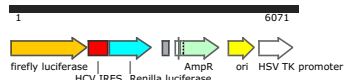
cgccgcTACCTTCTGCGGTTTTTGTAT

Fragment.REV

Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ Fragment.FOR	39-mer	740 .. 778	⇌	74°C
/sequence	= CCCTGCAGCGACCCGCTTAAccctttactcctggctgcg 64% GC / 11.791,6 Da			
✓ Vector.REV	39-mer	741 .. 779	⇌	75°C
/sequence	= ccgcagccaggagtaaagggTTAAGCGGGTCGCTGCAGG 64% GC / 12.147,9 Da			
beta-globin rev	38-mer	747 .. 759	⇌	48°C
/sequence	= acacagttgtgtcagaagcaatgtTTAAGCGGGTCGC 47% GC / 11.766,7 Da			
✓ Vector.FOR	48-mer	897 .. 944	⇌	74°C
/sequence	= tagcctcctgccccgcggcgATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAG 54% GC / 14.782,7 Da			
✓ Fragment.REV	32-mer	905 .. 936	⇌	73°C
/sequence	= ATGTTTTTGCGCTCTCCATcgccgcggggca 59% GC / 9814,4 Da			
beta-globin fwd	43-mer	917 .. 934	⇌	54°C
/sequence	= tcactagcaacctcaaacagacaccATGGAAGACGCCAAAAAC 47% GC / 13.129,6 Da			



Pim-1 5'UTR
6188 bp

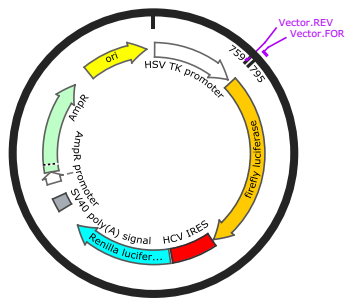


Fragment
197 bp

Linearized Vector
6071 bp

PCR
Amplify 795 .. 759 using:
Vector.FOR
Vector.REV

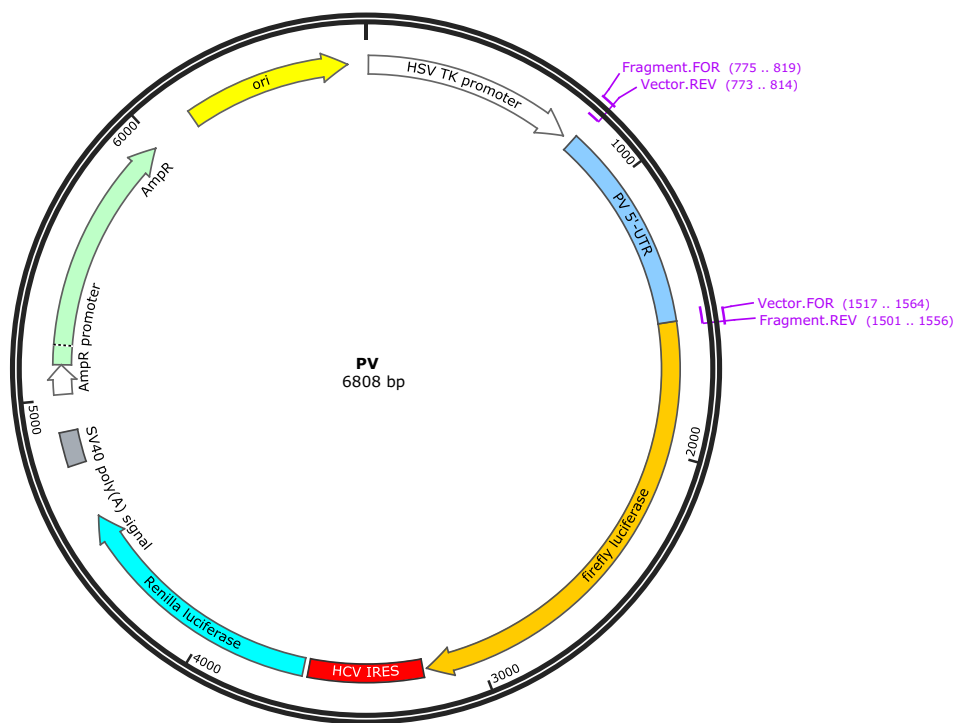
PCR
Amplify 1 .. 157 using:
Fragment.FOR
Fragment.REV



Dual-luc-IRES
6066 bp



Pim-1 mRNA Variante 1 (NM_001243186.1)
2751 bp



Fragment.FOR

5' ATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCTtaaaacagctctggtgtgtaccaccccagaggccc 832

3' TAAAGCCATGACAACCATTTTCGGTGGAattttgtcgagaccccaacatgggtgggtgtctcggg

PV 5'-UTR

Vector.REV

GCCATGACAACCATTTTCGGTGGAattttgtcgagaccccaac

acgtggcggcctagtagtactccggtattgctggtaccctgtacgcctgttttatactcccttccgt 896

tgacccgcccgcgatcatgaggccataacgccatgggaacatgcggaacaaatagagggaaggcca

PV 5'-UTR

aacttagacgcacaaaaaccaagttcaatagaaggggtacaaaccagtaccaccacgaacaagc 960

ttgaatctgcgtgttttgggtcaagttatcttccccatgtttgggtcatggtggtgtctgttcg

PV 5'-UTR

acttctgtttccccggtgatgtcgtatagactgcttgcgtggttgaagcgacggatccgttat 1024

tgaaagacaaagggccactacagcatalctgacgaacgcaccaactttcgtcgtcctaggcaata

PV 5'-UTR

ccgttatgtacttcgagaagcccagtagaccctcggaattctcgtatgcgttgcgtcagcact 1088

ggcgaatacatgaagctcttcgggtcatggtggagccttagaagctacgcaacgcgagtcgtga

PV 5'-UTR

caaccccagagtgtagcttaggctgatgagctctggacatccctcaccggtgacggtggtccagg 1152

gttgggtctcacatcgaatccgactactcagacctgtaggagtggtgacctgccaccagggtcc

PV 5'-UTR

ctgcgttggcgcctacctaaggctaacgccatgggacgctagtgtgaacaagggtggaagag 1216

gacgcaaccgcggatggataccgattgcggtaccctgcgatcaacacttgttccacacttctc

PV 5'-UTR

cctattgagctacataagaatcctccggccctgaatgctggtcaatcccaacctcggagcaggt 1280

ggataaactcgatgtattcttaggagccggggacttacgccgattaggggtggagcctcgtcca

PV 5'-UTR

ggtcacaaaccagtgattggcctgtcgtaacgcgcaagtcggtggcggaaccgactactttggg 1344

ccagtgttggctactaacggacagcattgcgcgttcaggcaccgccttggctgatgaaaccc

PV 5'-UTR

tg

tcc

gtgt

ttcc

tttt

tatt

ttatt

gtgg

ctgc

ttat

gg

tgaca

atcac

agatt

gttat

cataa

1408

ac

aggc

acaa

aggaaa

ataaaa

ataac

accg

acga

ataacc

actgt

tagt

gtct

aaca

tagtat

PV 5'-UTR

ag

cga

attgg

attgg

ccat

ccgg

tga

aagt

gag

actc

attat

ctat

ctgt

ttg

ctgg

atcc

gct

1472

tc

gct

taac

cta

accg

tagg

ccact

ttc

actc

tgt

ag

ta

tag

atag

acaa

cga

cctag

gcga

PV 5'-UTR

cc

attg

agtgt

gttt

tact

cta

agtaca

attt

ca

cag

ttatt

tc

aatc

agaca

attgt

atcata

1536

gg

ta

actc

acaca

aatg

agatt

catgt

ttaa

agtt

gtca

ataa

agtt

agtct

gtta

acata

gtat

PV 5'-UTR

aa

agtt

gtca

ataa

agtt

agtct

gtta

acata

gtat

Fragment.REV

AT

GGAA

GACG

CCAAAA

ACATA

AA

GAAAG

3'

1600

AT

GGAA

GACG

CCAAAA

ACATA

AA

GAAAG

GCCC

GGCG

CCATT

CTAT

CCG

CTG

GAA

GAT

GGA

ACCG

5'

1

5

10

15

20

Met

Glu

Asp

Ala

Lys

Asn

Ile

Lys

Lys

Gly

Pro

Ala

Pro

Phe

Tyr

Pro

Leu

Glu

Asp






Gly

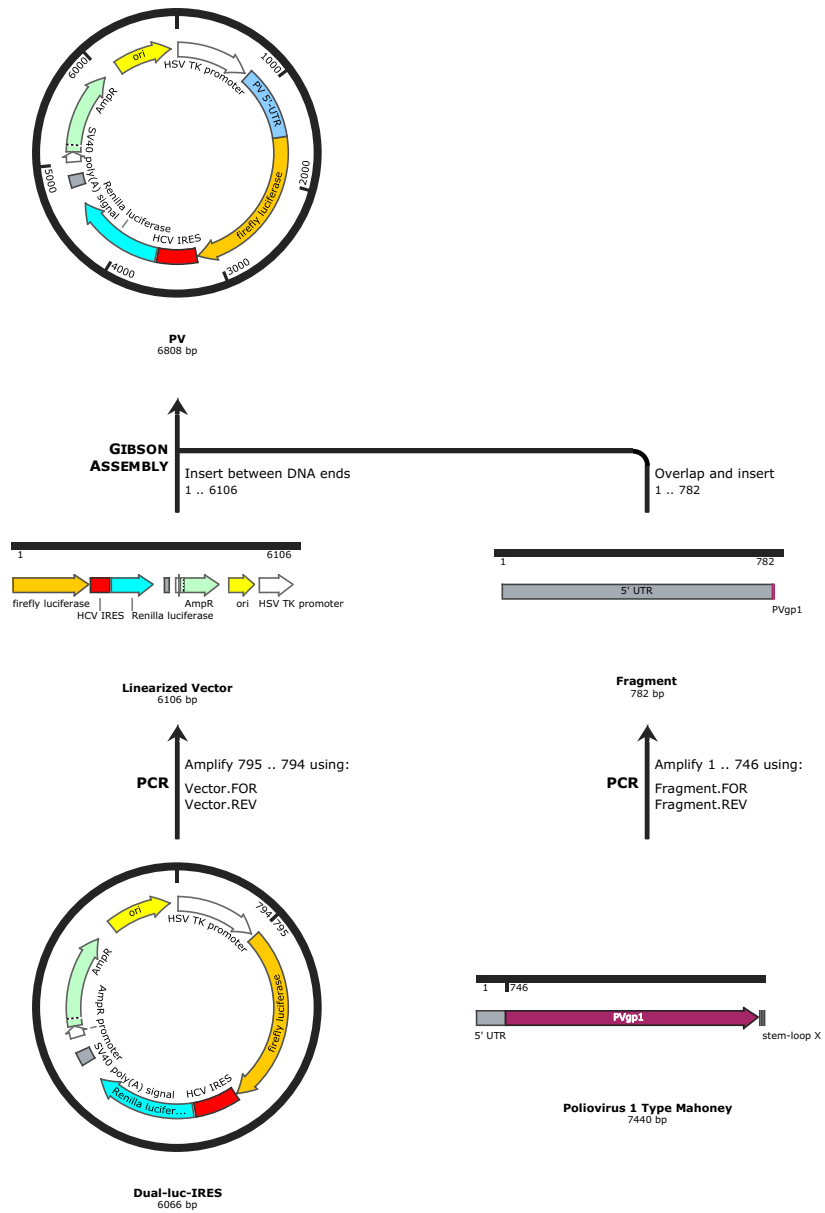
Thr

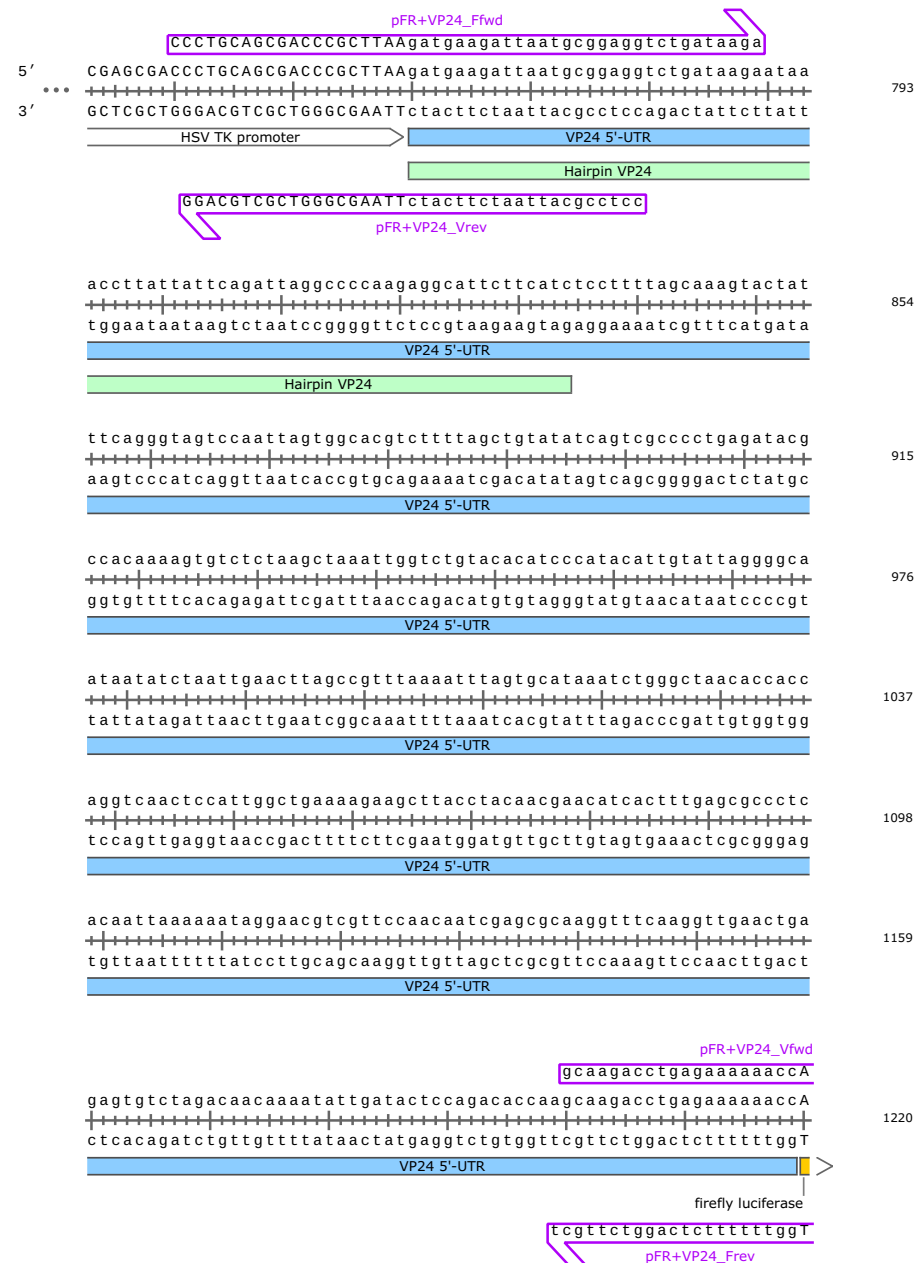
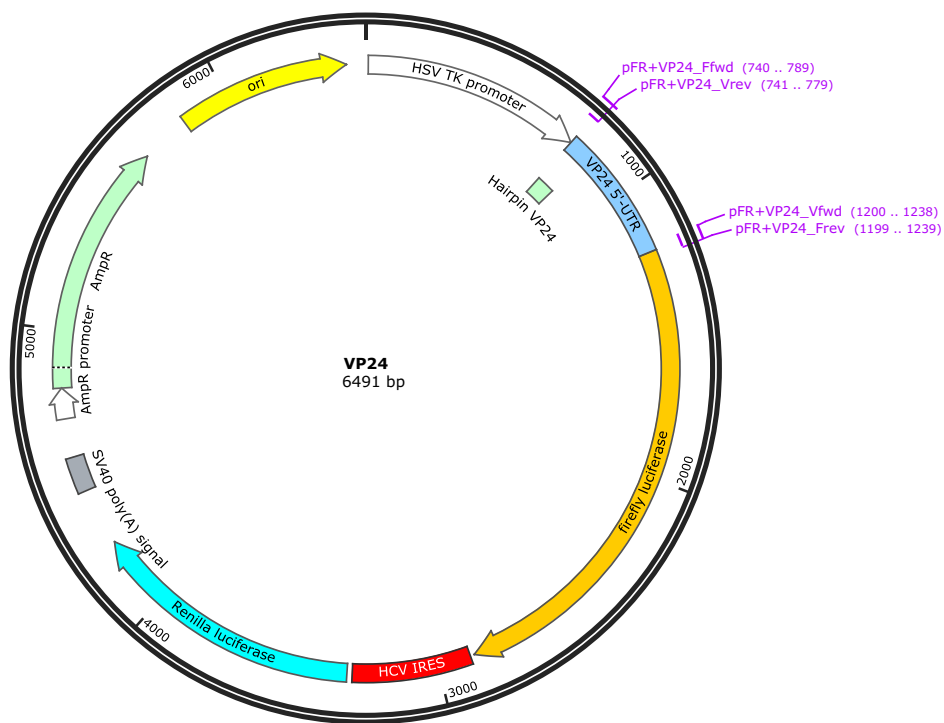
firefly luciferase

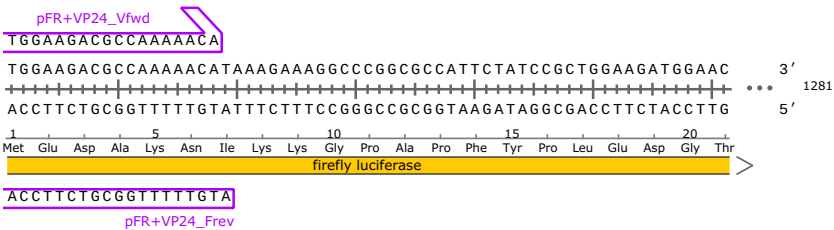
TACCTTCTGCGGTTTTTGTAT

Fragment.REV

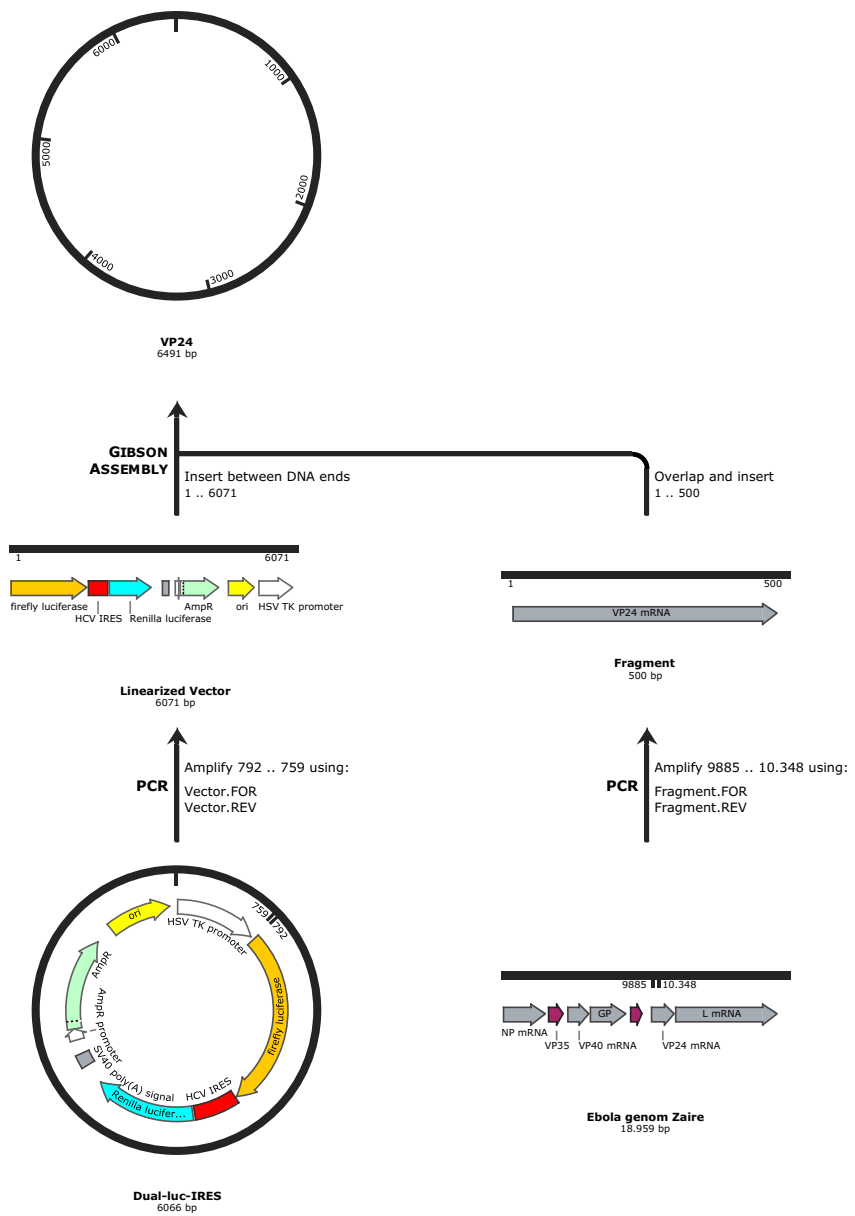
Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ Vector.REV	42-mer	773 .. 814		69°C
/sequence	= caacccagagctgttttaaGGTGGCTTTACCAACAGTACCG 50% GC / 12.858,4 Da			
✓ Fragment.FOR	45-mer	775 .. 819		69°C
/sequence	= GTACTGTTGGTAAAGCCACcttaaacagctctggggtgtacc 49% GC / 13.836,0 Da			
✓ Fragment.REV	56-mer	1501 .. 1556		66°C
/sequence	= ATGTTTTTGGCGTCTTCCAAtatgatacaattgctgattgaaataactgttgaaa 30% GC / 17.262,4 Da			
✓ Vector.FOR	48-mer	1517 .. 1564		64°C
/sequence	= aatcacagaattgtatcataATGGAAGACGCCAAAACATAAAGAAAG 31% GC / 14.859,8 Da			

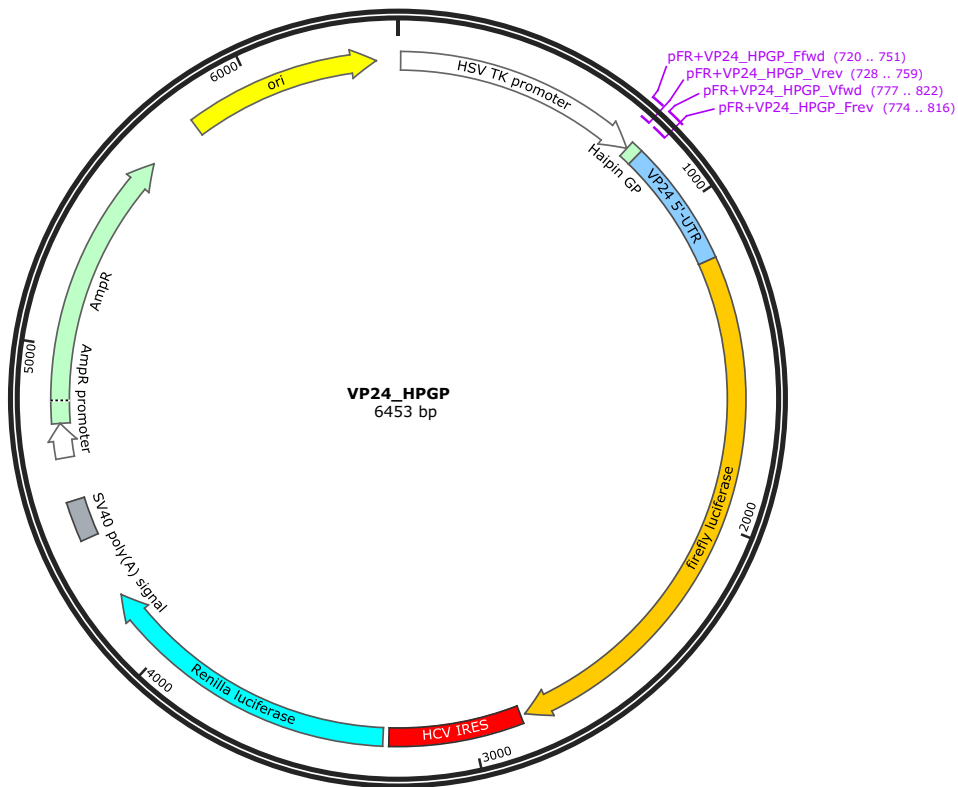







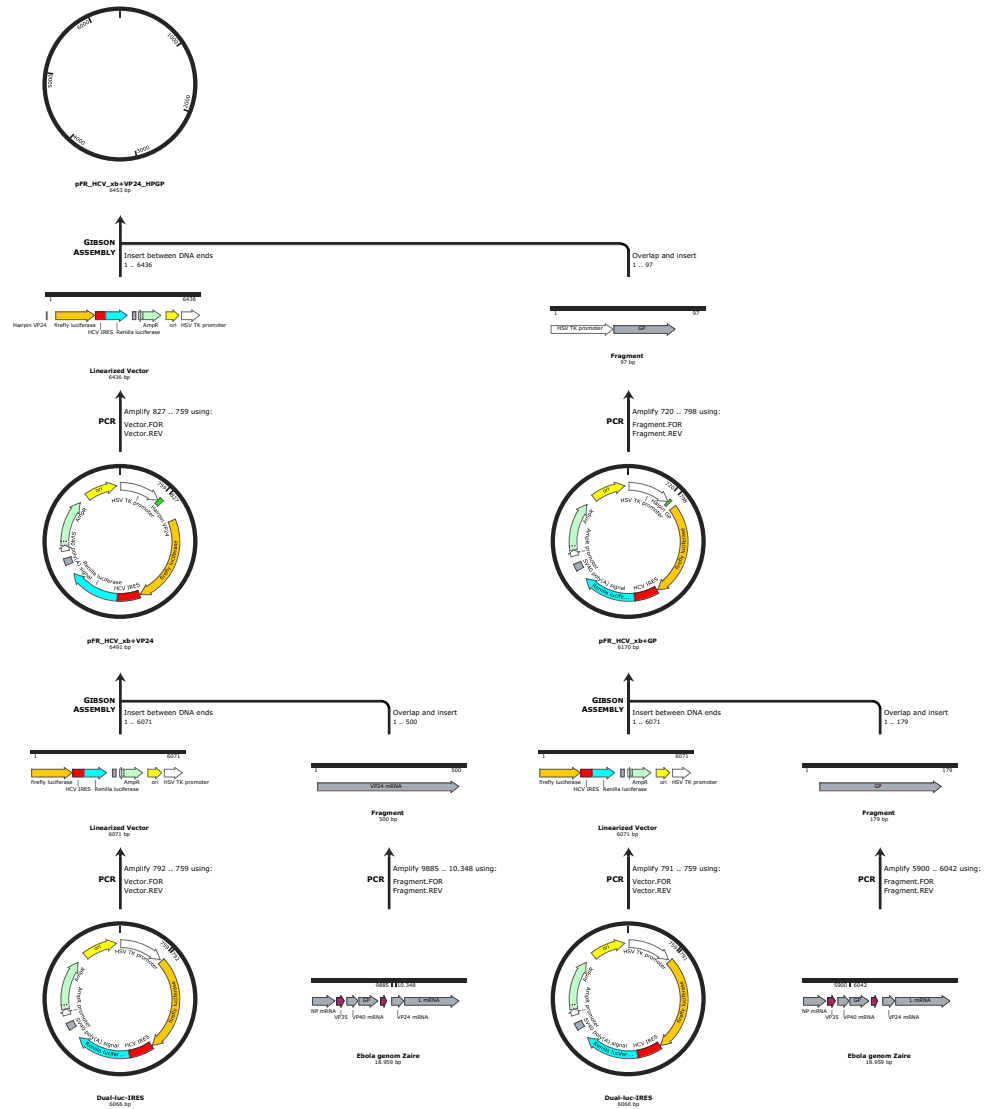
Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+VP24_Ffwd	50-mer	740 .. 789	⇌	71°C
/sequence	= CCCTGCAGCGACCCGCTTAAgatgaagattaatgcgaggtctgataaga			
	50% GC / 15.468,1 Da			
✓ pFR+VP24_Vrev	39-mer	741 .. 779	⇌	70°C
/sequence	= cctccgattaatcttcacTTAAGCGGGTCGCTGCAGG			
	54% GC / 11.909,8 Da			
✓ pFR+VP24_Frev	41-mer	1199 .. 1239	⇌	68°C
/sequence	= ATGTTTTTGGCGTCTTCCATggttttttcaggtcttgct			
	41% GC / 12.542,2 Da			
✓ pFR+VP24_Vfwd	39-mer	1200 .. 1238	⇌	67°C
/sequence	= gcaagacctgagaaaaaacATGGAAGACGCCAAAAACA			
	44% GC / 12.046,9 Da			

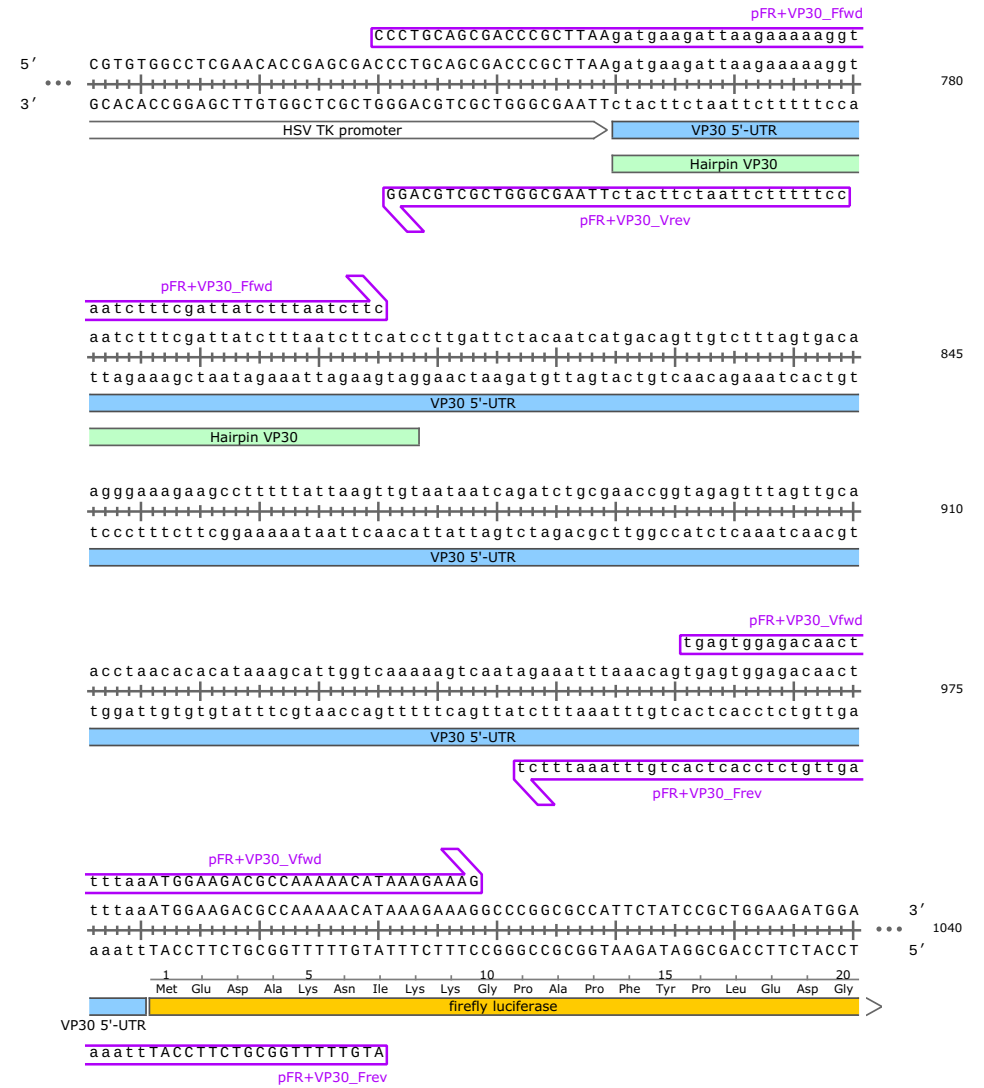
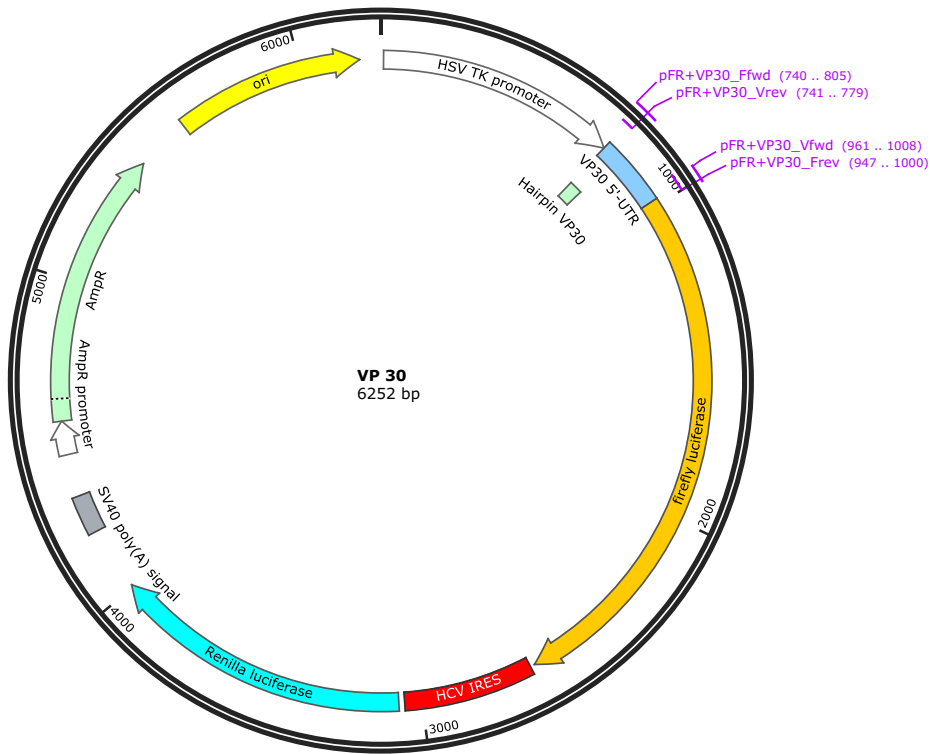




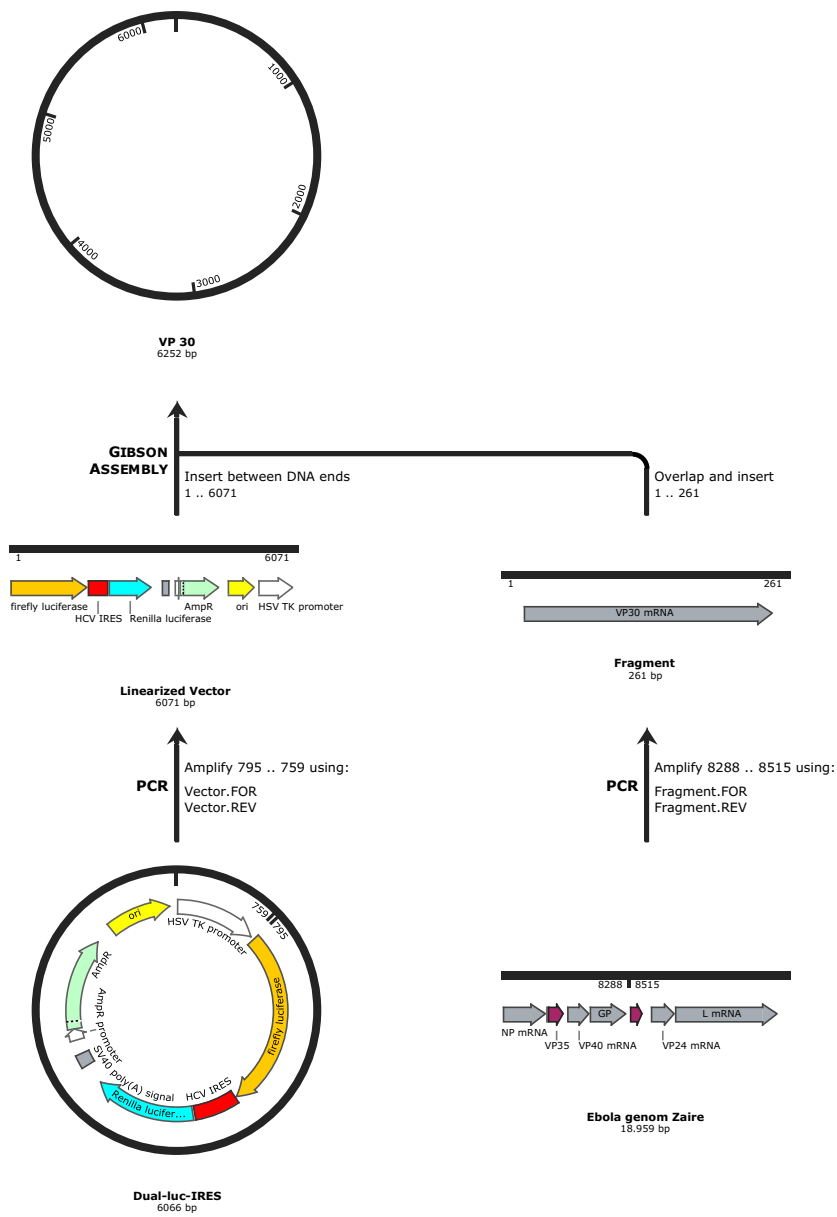
pFR+VP24_HPGP_Fwd
 TGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGAC
 pFR+VP24_HPGP_Vfwd
 cagt
 5' CGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAAGatgaagattaagccgacagt
 3' GCACACCGGAGCTTGTGGCTCGCTGGGACGTCGCTGGGCGAATTtctacttctaattcggctgtca
 HSV TK promoter
 Haipin GP
 TGTGGCTCGCTGGGACGTCGCTGGGCGAATT
 pFR+VP24_HPGP_Vrev
 gctgtca
 pFR+VP24_HPGP_Frev
 gagcgtaatcttcatctccttttagcaaagtactatttcagg
 gagcgtaatcttcatctccttttagcaaagtactatttcagggtagttccaaattagtggcacgtct
 ctcgcattagaagtagaggaaaatcggttcatgataaaagtcctcaggttaaccacggtgcaga
 Haipin GP
 VP24 5'-UTR
 ctcgcattagaagtagaggaaaatcggttcatgata
 pFR+VP24_HPGP_Frev
 tttagctgtatatcagtcgccccctgagatacgccacaaaagtgtctctaagctaaattggctgt
 aaatcgacatatagtcagcgggactctatgcggtgttttcacagagattcgatttaaccagaca
 VP24 5'-UTR
 acacatcccatacatgtattaggggcaataatatctaattgaacttagccgtttaaatttagt
 tgtgtagggtatgtaacataatccccgttattatagattaacttgaatcggaatttttaaatca
 VP24 5'-UTR
 gcataaatctgggctaaccaccagggtcaactccattggctgaaaagaagcttacctacaacga
 cgtatttagaccgatgtgtgtgtgtccagttgaggttaaccgacttttcttcgaatggatgttgc
 VP24 5'-UTR
 acatcactttgagcgccctcacaattaaaaataggaacgtcgttccaacaatcgagcgcaaggt
 tgtagtgaactcgcgaggatgttaatttttatccttgcagcaaggtgttagctcgcgttcca
 VP24 5'-UTR
 ttcaaggttgaactgagagtgctctagacaacaaaattattgatactccagacaccaagcaagacct
 aagttccaacttgactctcacagatctgtgtttataactatgaggtctgtggttcgttctgga
 VP24 5'-UTR
 gagaaaaaacCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAA
 ctcttttttggTACCTTCTGCGGTTTTTGTATTTCTTCCGGGCGCGGTAAGATAGGCGACCTT
 1 5 10 15
 Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro Leu Glu
 VP24 5'-UTR
 firefly luciferase

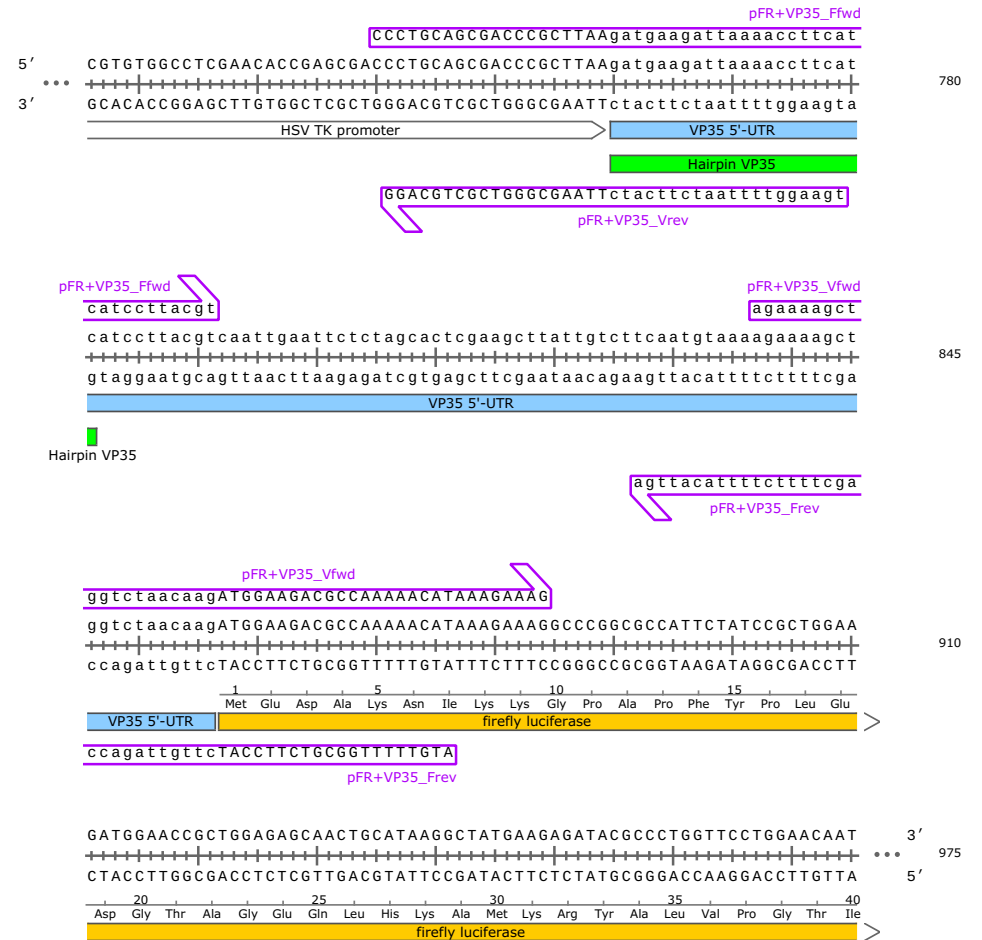
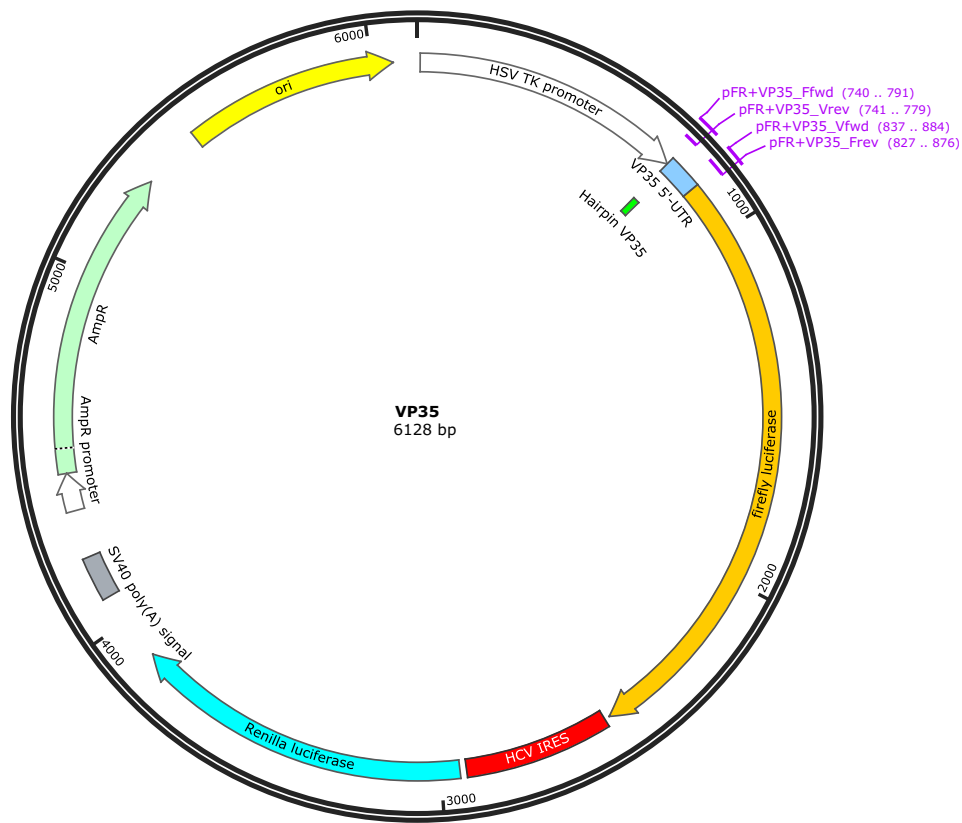
Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+VP24_HPGP_Ffwd	32-mer	720 .. 751		75°C
/sequence	= TGGCCTCGAACACCGAGCGACCTGCAGCGAC 69% GC / 9765,3 Da			
✓ pFR+VP24_HPGP_Vrev	32-mer	728 .. 759		73°C
/sequence	= TTAAGCGGGTCGCTGCAGGTCGCTCGGTGTT 63% GC / 9919,5 Da			
✓ pFR+VP24_HPGP_Frev	43-mer	774 .. 816		65°C
/sequence	= atagtactttgctaaaaggagatgaagattacgtcactgtcg 40% GC / 13.289,7 Da			
✓ pFR+VP24_HPGP_Vfwd	46-mer	777 .. 822		65°C
/sequence	= cagtgagcgtaatcttcatctcttttagcaaagtactatttcagg 39% GC / 14.089,2 Da			



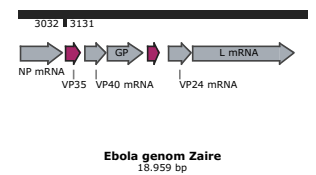
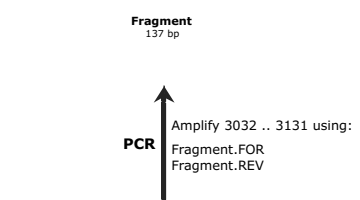
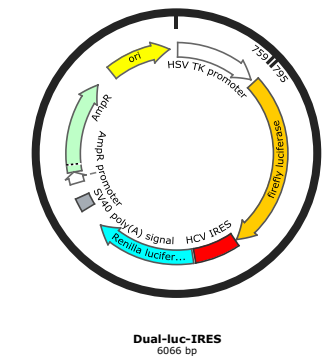
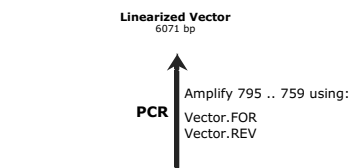
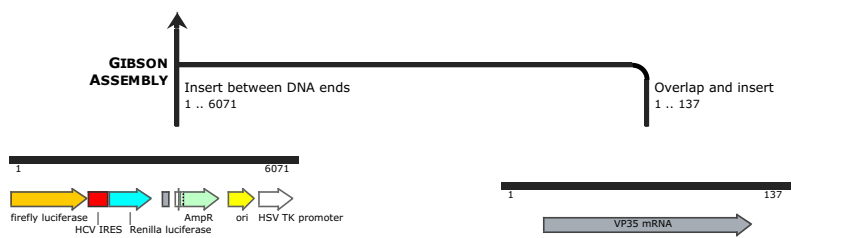
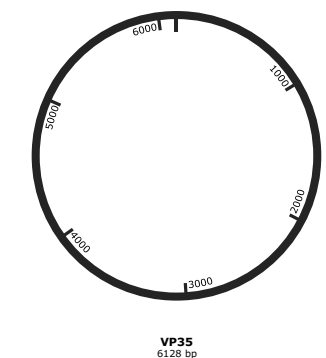


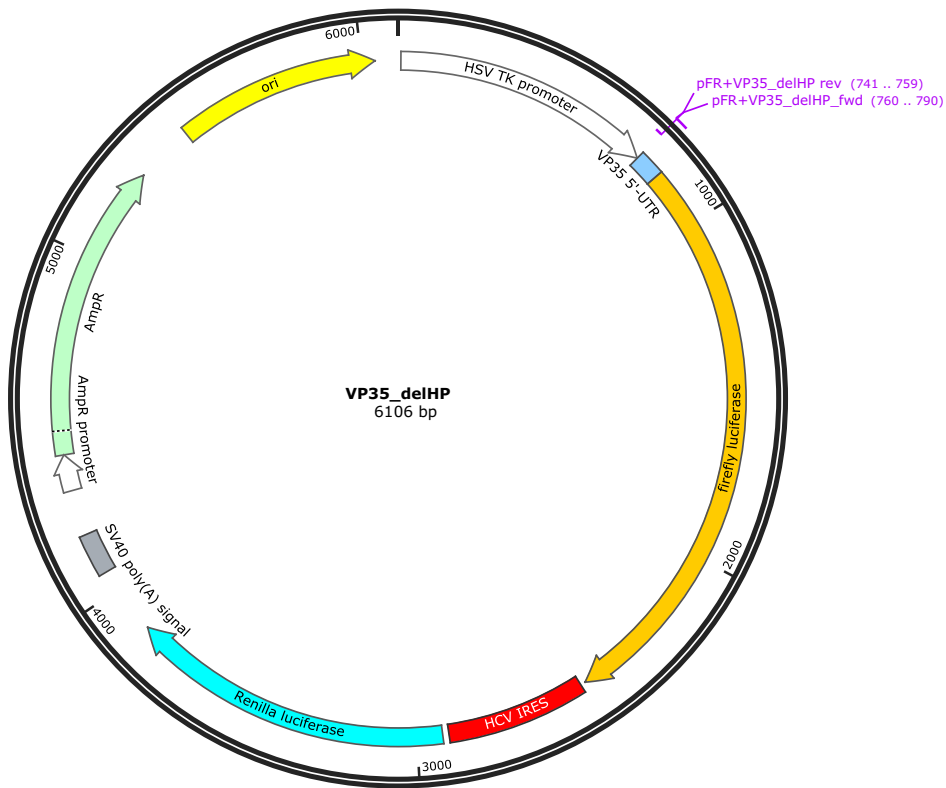
Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+VP30_Ffwd	66-mer	740 .. 805	⇌	68°C
/sequence	= CCCTGCAGCGACCCGCTTAAgatgaagattaagaaaaagtaatctttcgattatctttaatcttc 38% GC / 20.269,3 Da			
✓ pFR+VP30_Vrev	39-mer	741 .. 779	⇌	66°C
/sequence	= ccttttcttaatcttcacTTAAGCGGGTCGCTGCAGG 46% GC / 11.905,8 Da			
✓ pFR+VP30_Frev	54-mer	947 .. 1000	⇌	67°C
/sequence	= ATGTTTTTGCGTCTTCCATttaaagttgtctccactcactgtttaatttct 33% GC / 16.473,8 Da			
✓ pFR+VP30_Vfwd	48-mer	961 .. 1008	⇌	65°C
/sequence	= tgagtgagacaacttttaaATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAG 35% GC / 14.931,9 Da			





Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+VP35_Ffwd	52-mer	740 .. 791		71°C
/sequence	= CCCTGCAGCGACCCGCTTAAgatgaagattaaaaccttcataccttcacgt			
	46% GC / 15.851,4 Da			
✓ pFR+VP35_Vrev	39-mer	741 .. 779		67°C
/sequence	= tgaaggttttaatttcacTTAAGCGGGTCGCTGCAGG			
	46% GC / 12.043,9 Da			
✓ pFR+VP35_Frev	50-mer	827 .. 876		67°C
/sequence	= ATGTTTTTGGCGTCTTCCATcttgtagaccagctttcttttacattga			
	36% GC / 15.270,0 Da			
✓ pFR+VP35_Vfwd	48-mer	837 .. 884		67°C
/sequence	= agaaaaagctggtctaacaagATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAG			
	38% GC / 14.934,9 Da			





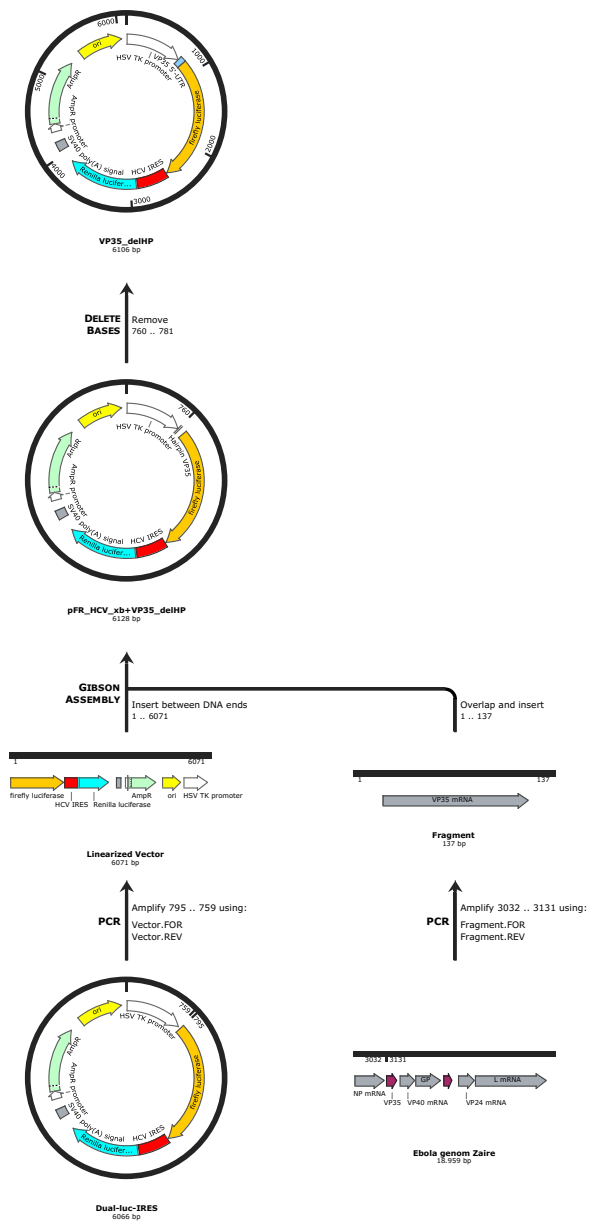


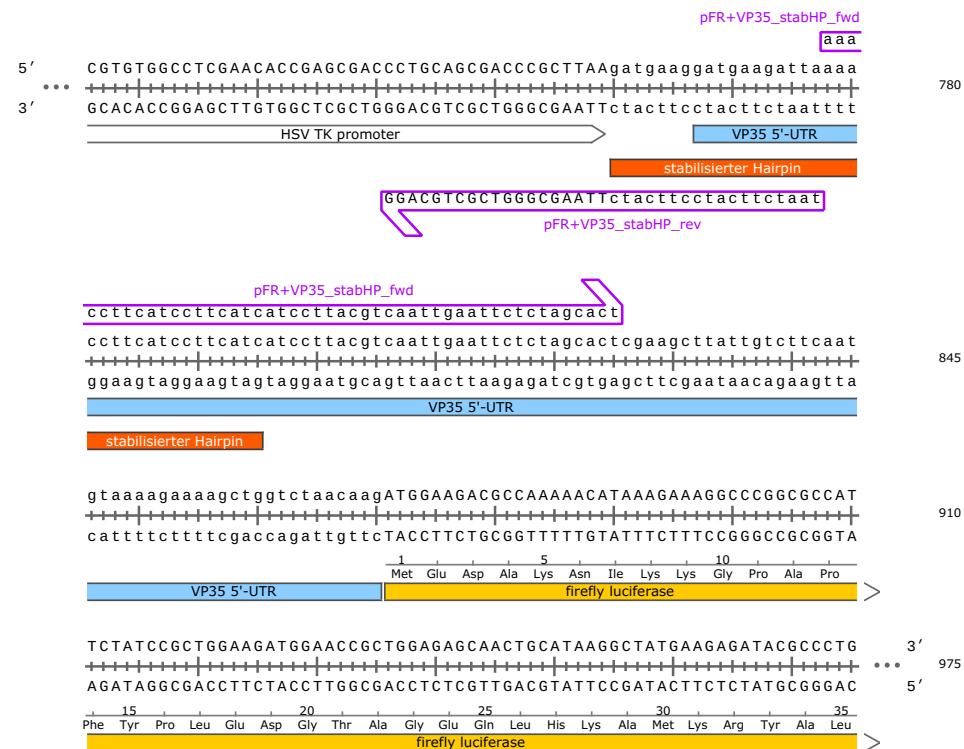
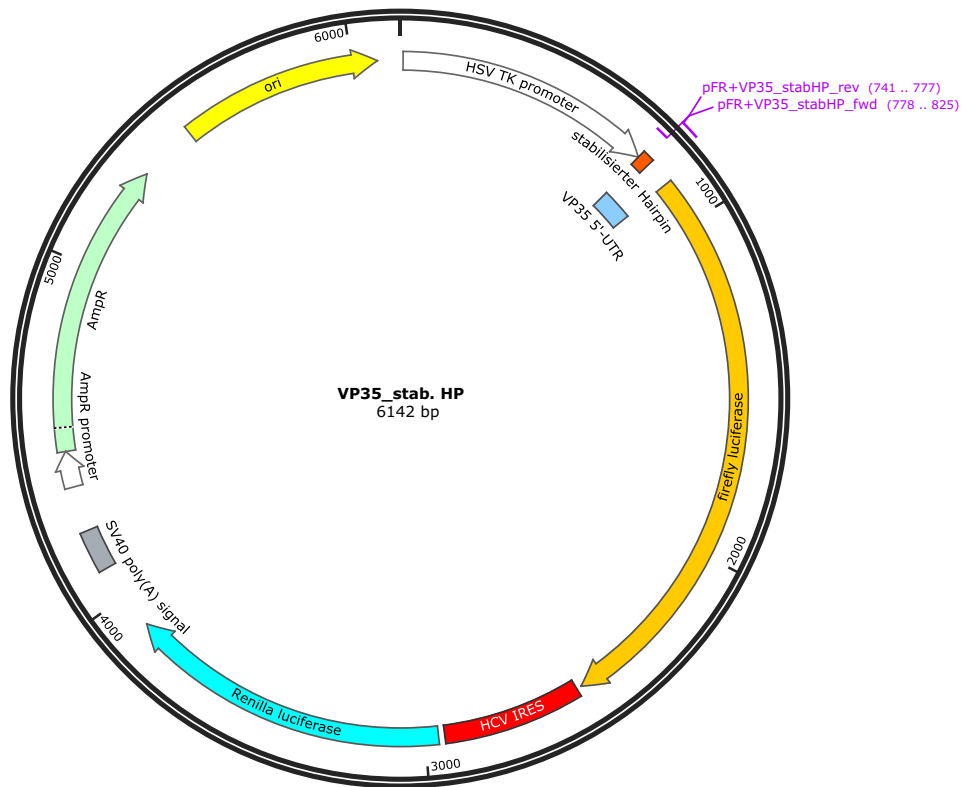
5' ATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGGCGGGTCCCAGGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACG
 ...
 3' TAAGCTTGTGCGTCTACGTCAGCCCCGCGGCCAGGGTCCAGGTGAAGCGTATAATTCCACTGC
 HSV TK promoter

pFR+VP35_delHP_fwd
 atcccttacgtcaattgaattc
 CGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCCTGCAGCGACCCGCTTAAatccttacgtcaattgaattc
 ...
 GCACACCGGAGCTTGTGGCTCGCTGGGACGTCGCTGGGCGAATTtaggaatgcagttaacttaag
 HSV TK promoter
 VP35 5'-UTR
 GGACGTCGCTGGGCGAATT
 pFR+VP35_delHP rev

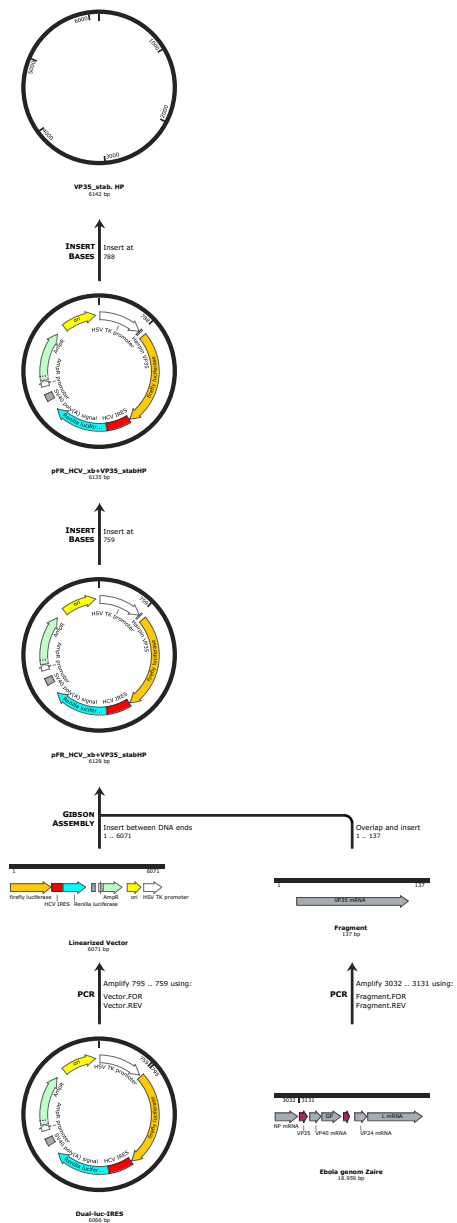
pFR+VP35_delHP_fwd
 tctagcactc
 tctagcactcgaagcttattgtcttcaatgtaaaagaaagctggtctaacaagATGGAAGACGC
 ...
 agatcgtgagcttcgaataacagaagttacattttcttttcgaccagattgttcTACCTTCTGCG
 1 Met Glu Asp Ala
 VP35 5'-UTR
 firefly luciferase
 CAAAAACATAAAGAAAGGCCGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAAC
 ...
 GTTTTGTATTTCTTTCGGGCCGCGGTAAGATAGGCGACCTTCTACCTTGGCGACCTCTCGTTG
 5 Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln
 firefly luciferase

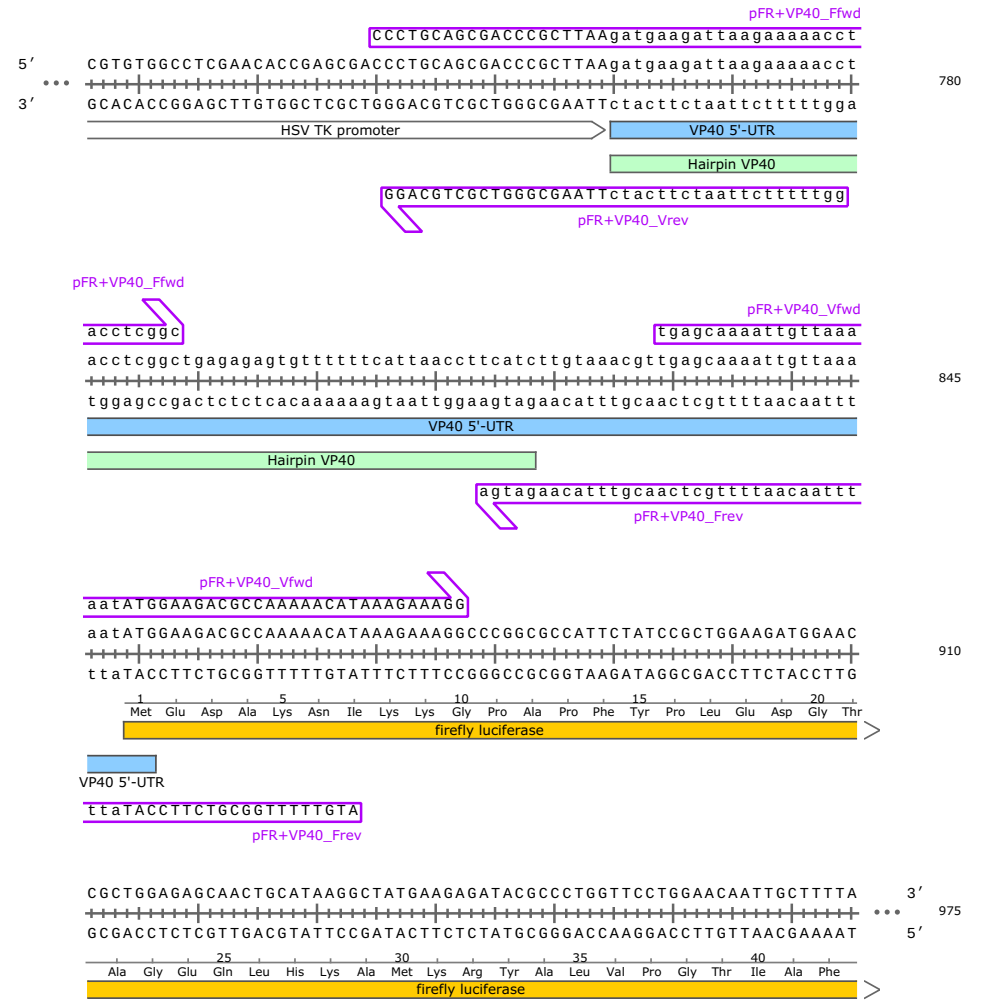
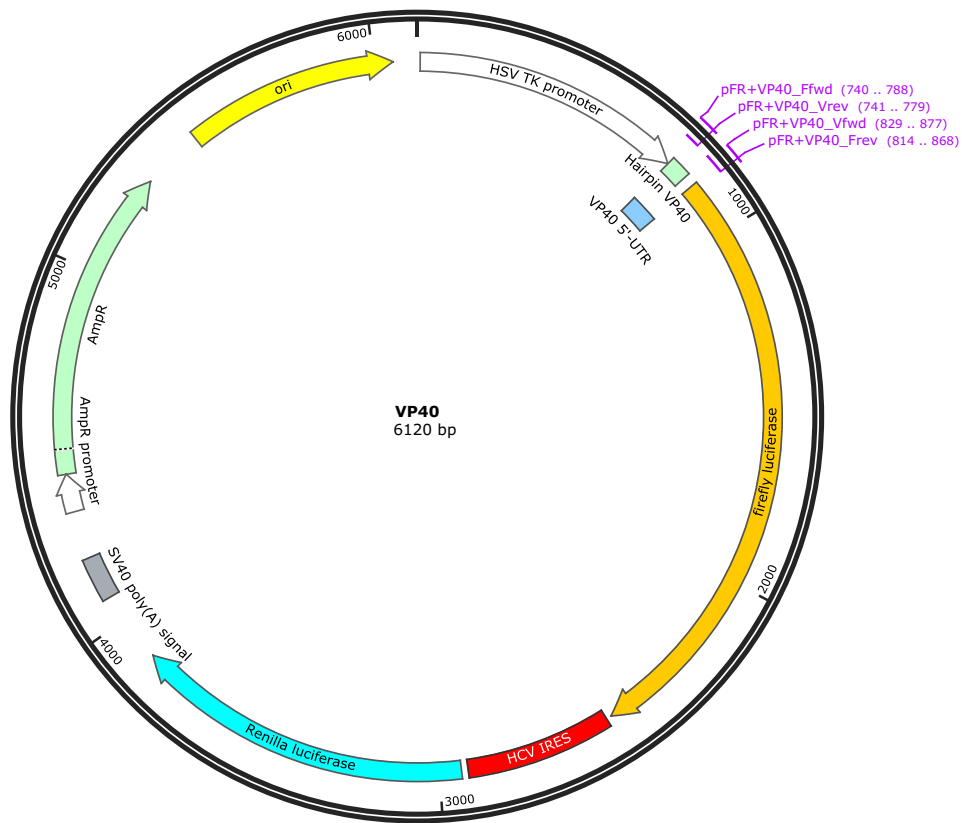
Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+VP35_delHP rev	19-mer	741 .. 759		61°C
/sequence	= TTAAGCGGGTCGCTGCAGG			
	63% GC / 5884,9 Da			
✓ pFR+VP35_delHP_fwd	31-mer	760 .. 790		60°C
/sequence	= atccttacgtcaattgaattctctagcactc			
	39% GC / 9380,2 Da			





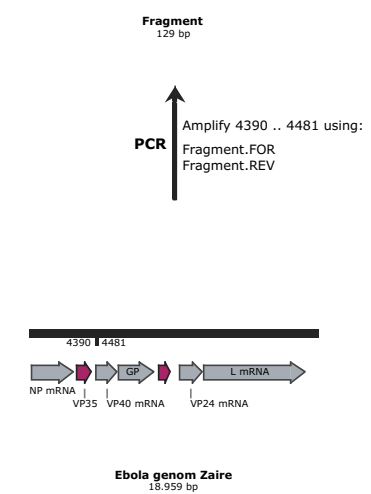
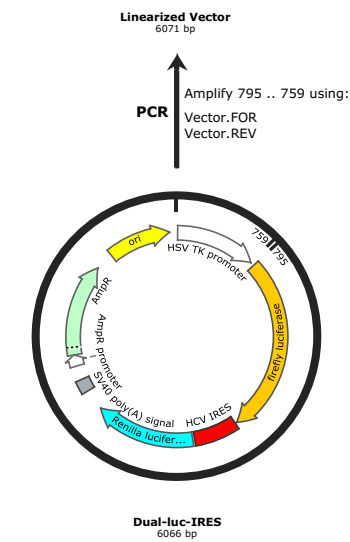
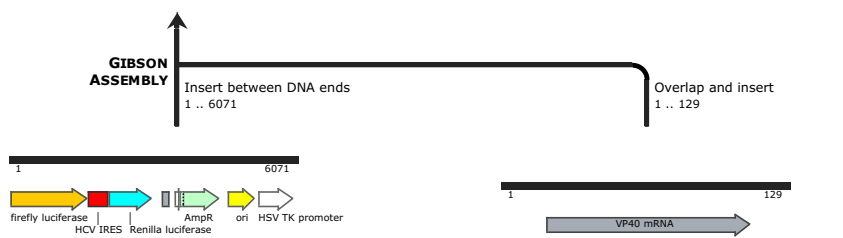
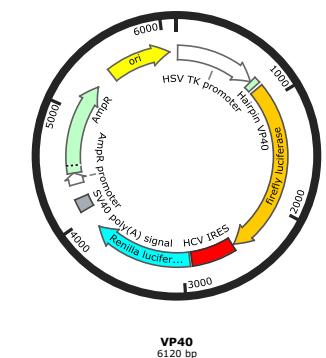


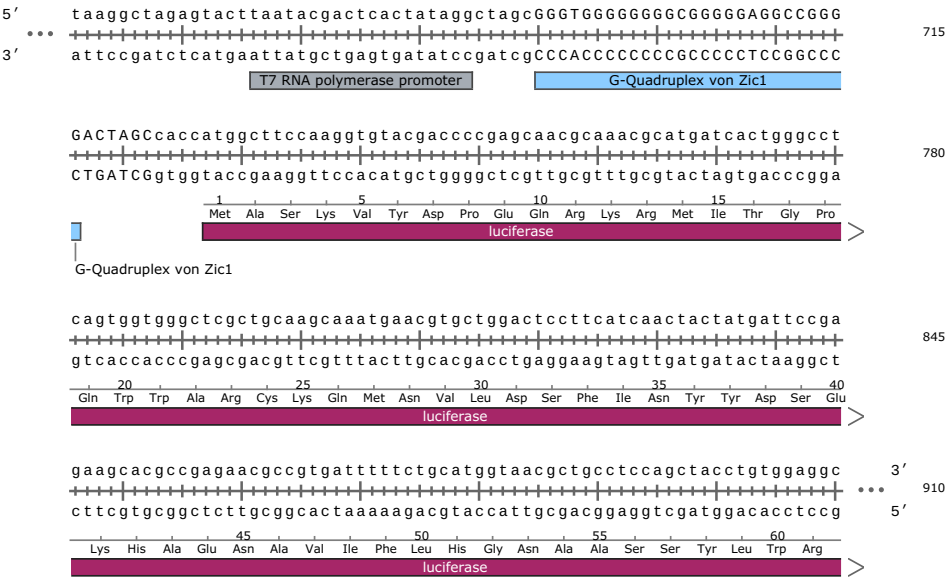
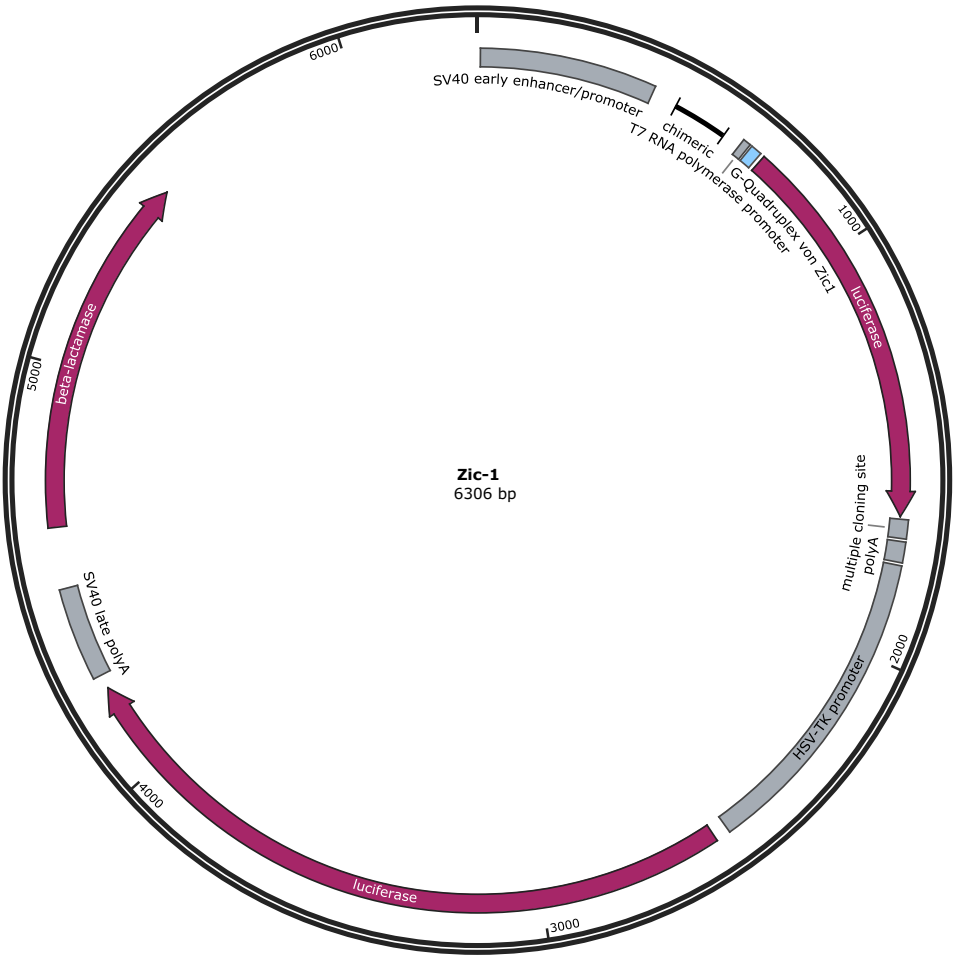
Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+VP35_stabHP_rev	37-mer	741 .. 777		67°C
/sequence	= taatcttcaccttcacTAAAGCGGGTCGCTGCAGG			
	49% GC / 11.306,4 Da			
✓ pFR+VP35_stabHP_fwd	48-mer	778 .. 825		67°C
/sequence	= aaaccttcaccttcacatccttacgtcaattgaattctctagcact			
	38% GC / 14.506,5 Da			

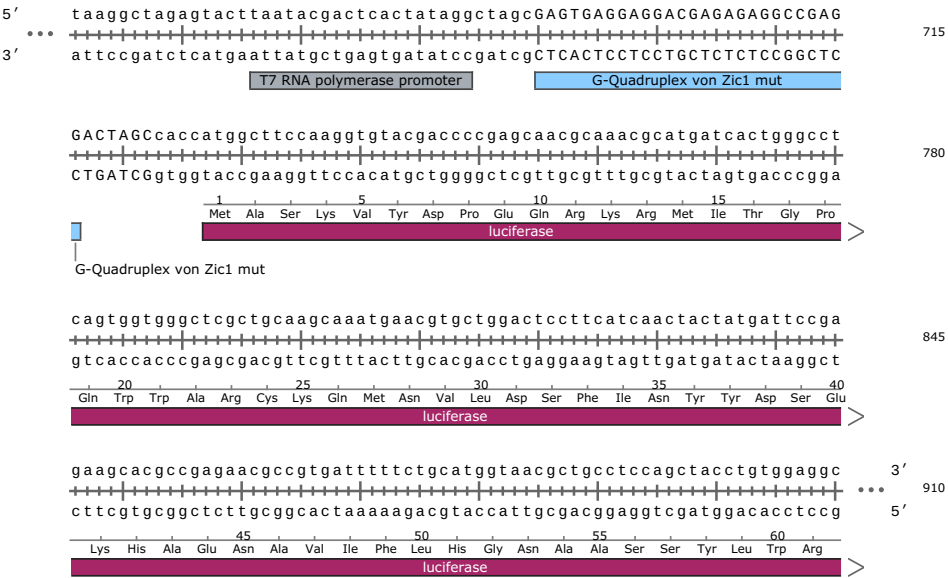
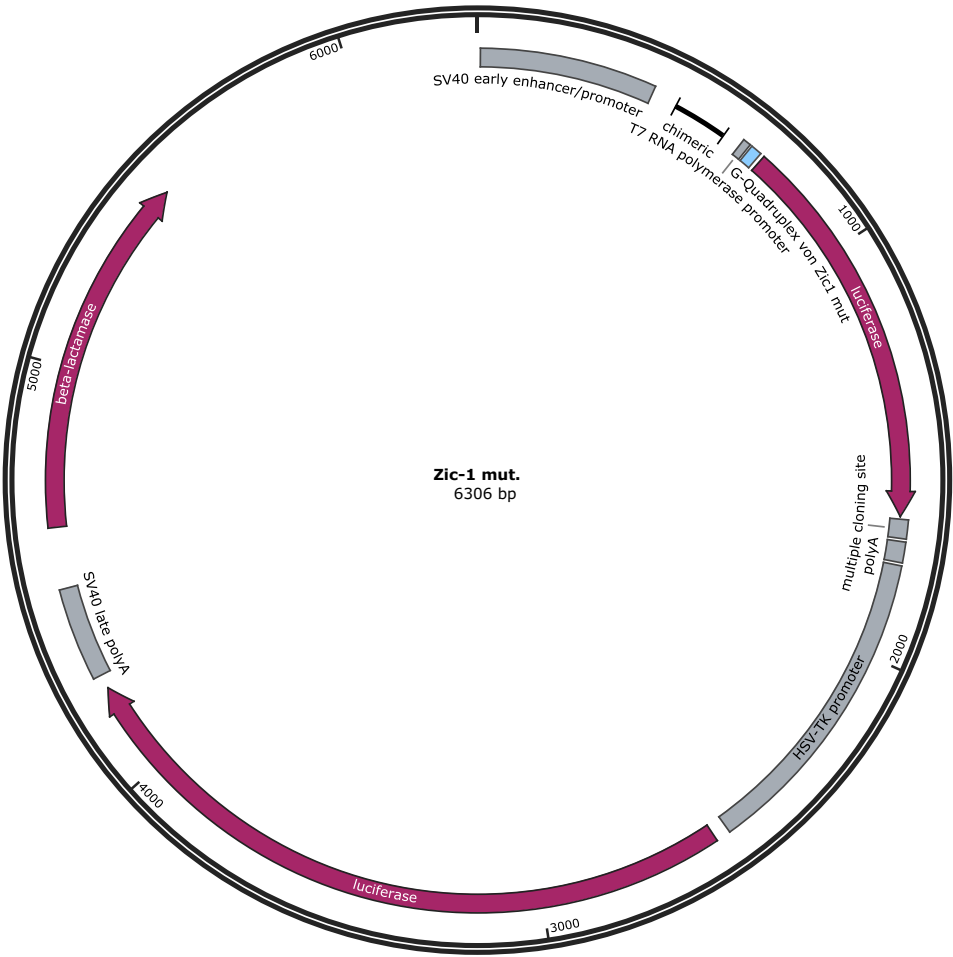


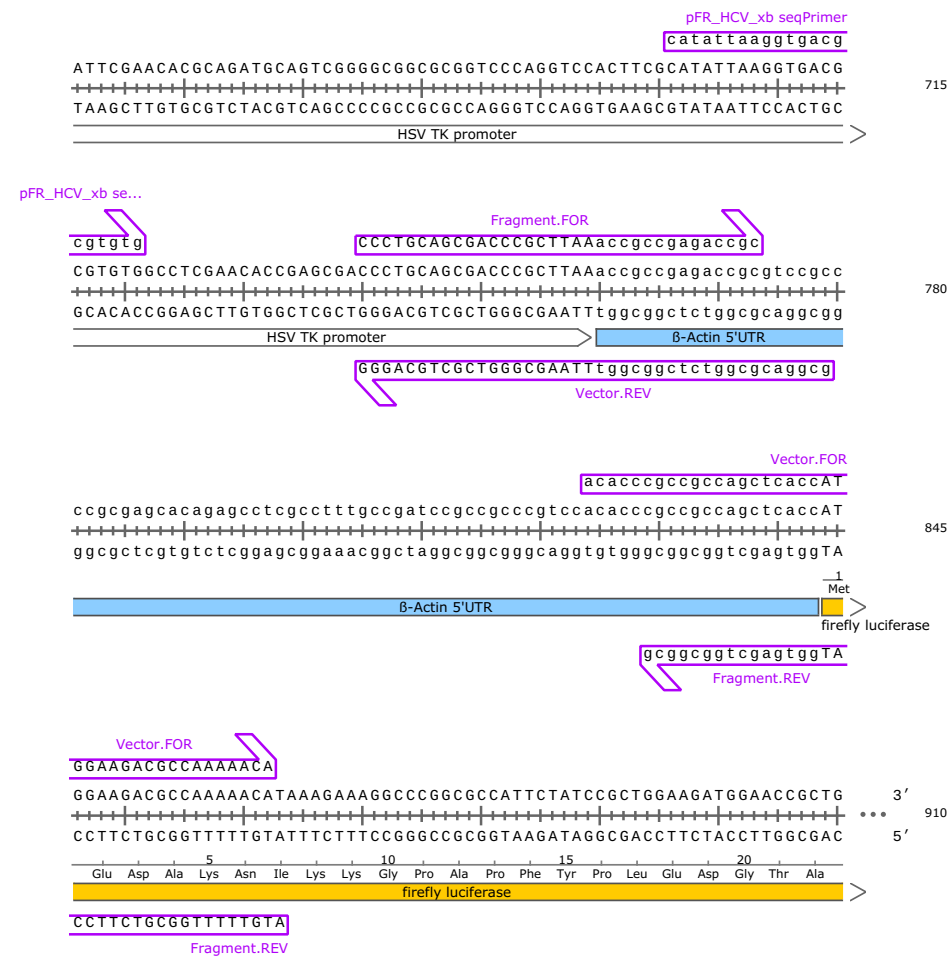







Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+VP40_Ffwd	49-mer	740 .. 788		71°C
/sequence	= CCCTGCAGCGACCCGCTTAAgatgaagattaagaaaaacctacctcggc			
	51% GC / 15.012,8 Da			
✓ pFR+VP40_Vrev	39-mer	741 .. 779		67°C
/sequence	= gggttttcttaatcttcacTTAAGCGGGTCGCTGCAGG			
	46% GC / 11.985,8 Da			
✓ pFR+VP40_Frev	55-mer	814 .. 868		66°C
/sequence	= ATGTTTTTGGCGTCTTCCATatttttaacaatttgctcaacgtttacaagatga			
	31% GC / 16.860,1 Da			
✓ pFR+VP40_Vfwd	49-mer	829 .. 877		64°C
/sequence	= tgagcaaaattgttaaaaATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGG			
	31% GC / 15.253,1 Da			

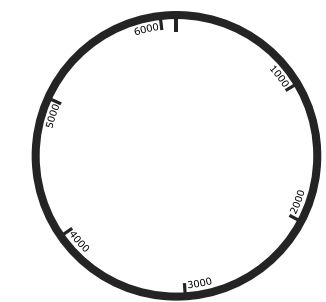




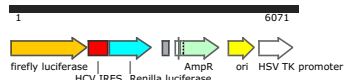




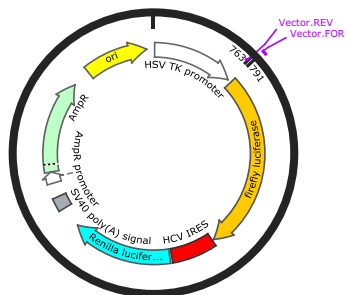
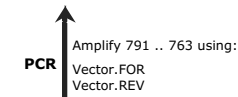
Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR_HCV_xb seqPrimer	21-mer	701 .. 721		56°C
/sequence	= catattaaggtgacgcgtgtg 48% GC / 6501,3 Da			
✓ Vector.REV	40-mer	740 .. 779		79°C
/sequence	= gcggacgcggtctcgcggtTTAAGCGGGTCGCTGCAGGG 73% GC / 12.467,1 Da			
✓ Fragment.FOR	34-mer	740 .. 773		75°C
/sequence	= CCCTGCAGCGACCCGCTTAaccgccgagaccgc 71% GC / 10.303,7 Da			
✓ Vector.FOR	39-mer	824 .. 862		75°C
/sequence	= acaccgccgcagctcaccATGGAAGACGCCAAAAACA 59% GC / 11.862,7 Da			
✓ Fragment.REV	35-mer	829 .. 863		72°C
/sequence	= ATGTTTTTGCGCTCTCCATggtgagctggcgcg 57% GC / 10.832,1 Da			
FF_Luc1_seqfwd	20-mer	875 .. 894		62°C
/sequence	= CGGCGCCATTCTATCCGCTG 65% GC / 6045,0 Da			



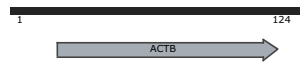
β-Actin 5'-UTR
6115 bp



Linearized Vector
6071 bp



Dual-luc-IRES
6066 bp









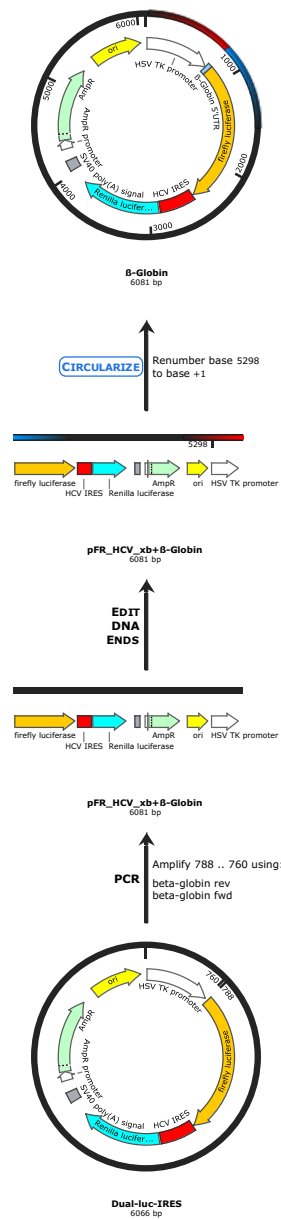
Fragment
124 bp

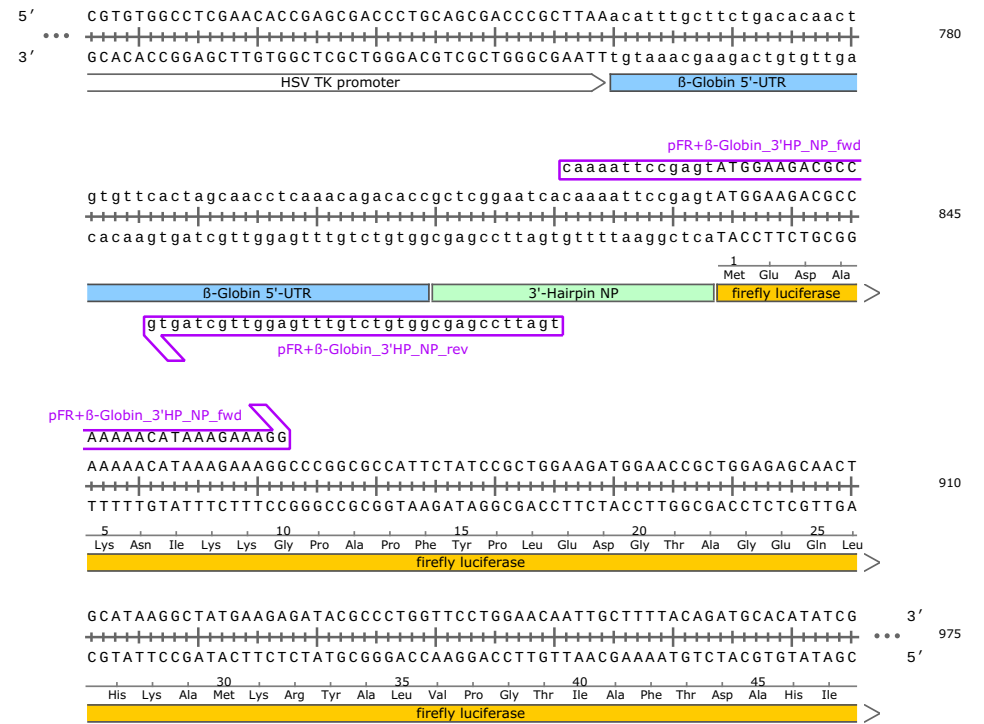
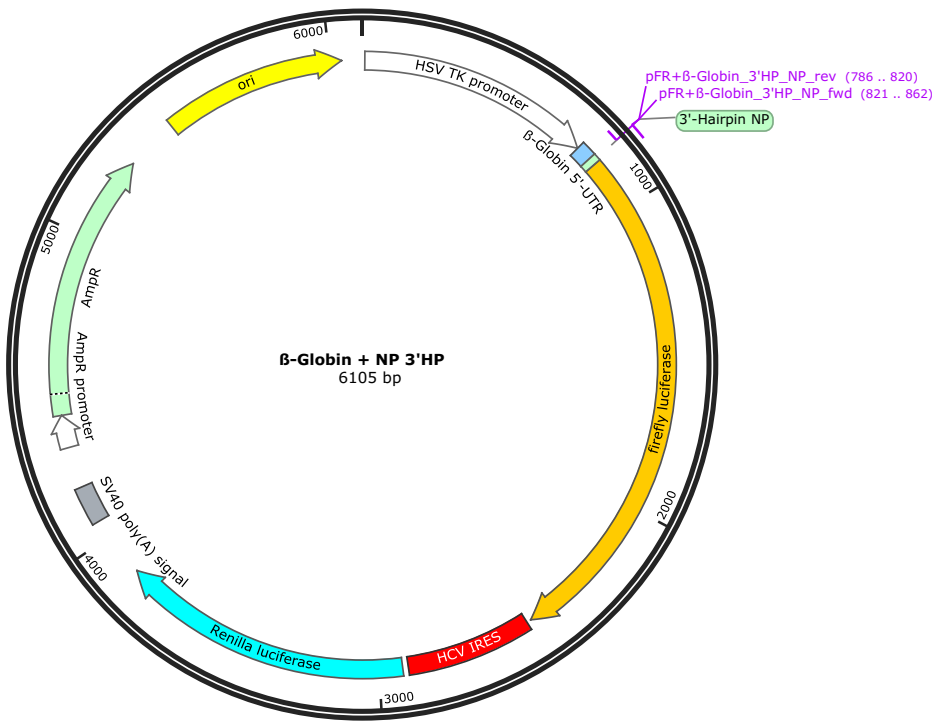





beta actin hsa mrna
1852 bp

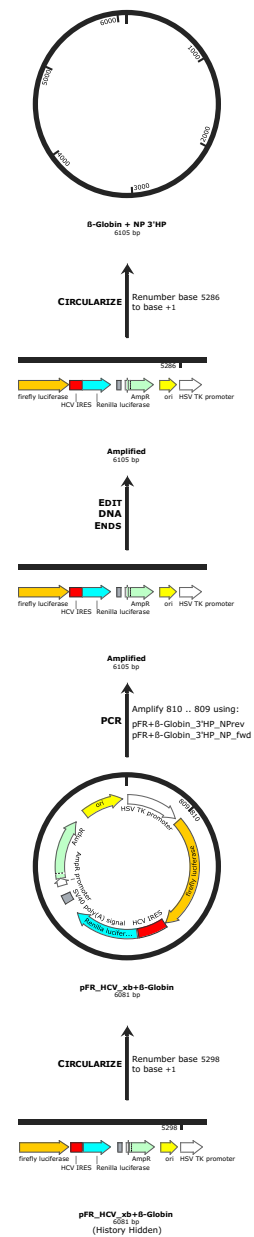


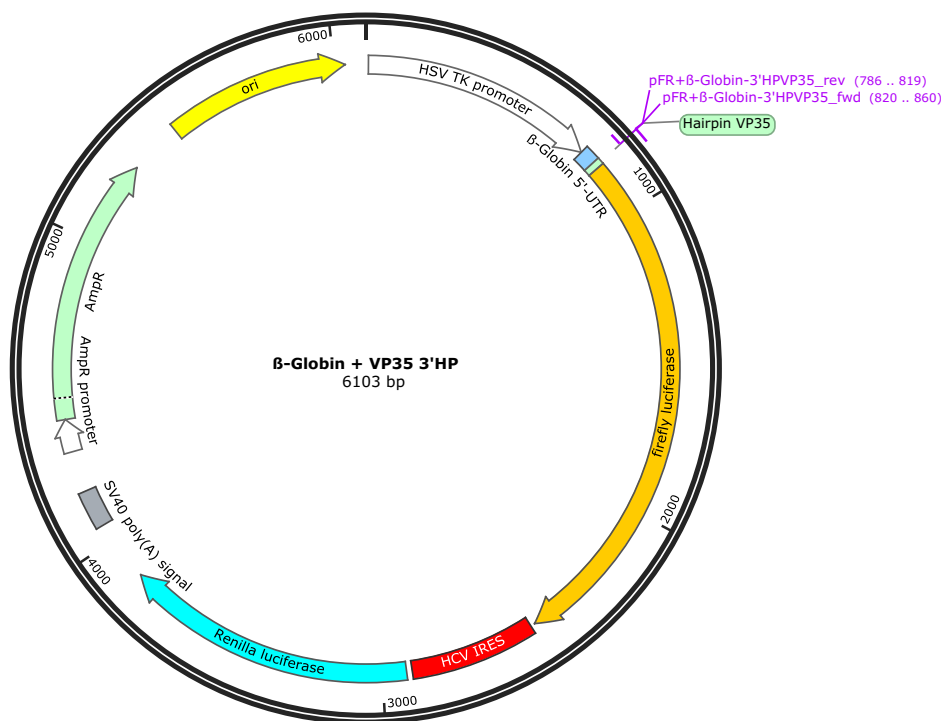
Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR_HCV_xb seqPrimer	21-mer	701 .. 721		56°C
/sequence	= catattaaggtgacgcgtgtg 48% GC / 6501,3 Da			
✓ beta-globin rev	38-mer	747 .. 784		69°C
/sequence	= acacagttgtgtcagaagcaaatgtTTAAGCGGGTCGC 47% GC / 11.766,7 Da			
✓ beta-globin fwd	43-mer	785 .. 827		69°C
/sequence	= tcactagcaacctcaacagacaccATGGAAGACGCCAAAAAC 47% GC / 13.129,6 Da			
✓ FF_Luc1_seqfwd	20-mer	841 .. 860		62°C
/sequence	= CGGCGCCATTCTATCGCTG 65% GC / 6045,0 Da			
✓ pFR_HCV_xb universal rev	21-mer	895 .. 915		56°C
/sequence	= CCAGGGCGTATCTCTTCATAG 52% GC / 6397,2 Da			





Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+β-Globin_3'HP_NP_rev	35-mer	786 .. 820		68°C
/sequence	= tgattccgagcgggtctgtttgaggtgctagtg			
	51% GC / 10.871,1 Da			
✓ pFR+β-Globin_3'HP_NP_fwd	42-mer	821 .. 862		64°C
/sequence	= caaaattccgagtATGGAAGACGCCAAAAACATAAGAAAGG			
	38% GC / 13.023,6 Da			





5' ... CGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCCTGCAGCGACCCGCTTAAcatttgcctcttgacacaact
3' GCACACGGAGCTTGTGGCTCGCTGGGACGTCGCTGGGCGAATTtgtaaacgaagactgtgttga

HSV TK promoter

β-Globin 5'-UTR

pFR+β-Globin-3'HPVP35_fwd
aaaaccttcattcATGGAGACGCCAA

gtgttcactagcaacctcaaacagacaccgatgaagattaaaaccttcattcATGGAGACGCCAA
cacaagtgatcgttggagtttgtctgtggctacttctaattttggaagtagTACCTTCTGCGGTT

β-Globin 5'-UTR

Hairpin VP35

firefly luciferase

gtgatcgttggagtttgtctgtggctacttctaa

pFR+β-Globin-3'HPVP35_rev

1 Met Glu Asp Ala Lys 5

pFR+β-Globin-3'HPVP35_fwd
AAACATAAAGAAAGG

AAACATAAAGAAAGGCCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGC
TTTGTAATTTCTTTCCGGCCCGGTAAGATAGGCGACCTTCTACCTTGGCGACCTCTCGTTGACG

Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu




firefly luciferase

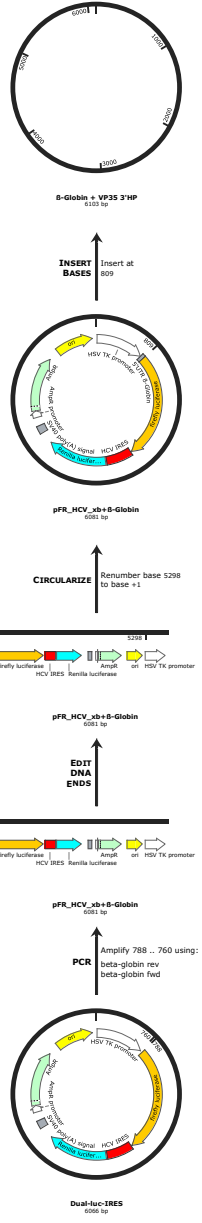
ATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAG
TATTCGATACTTCTCTATGCGGGACCAAGGACCTTGTTAACGAAAATGTCTACGTGTATAGCTC

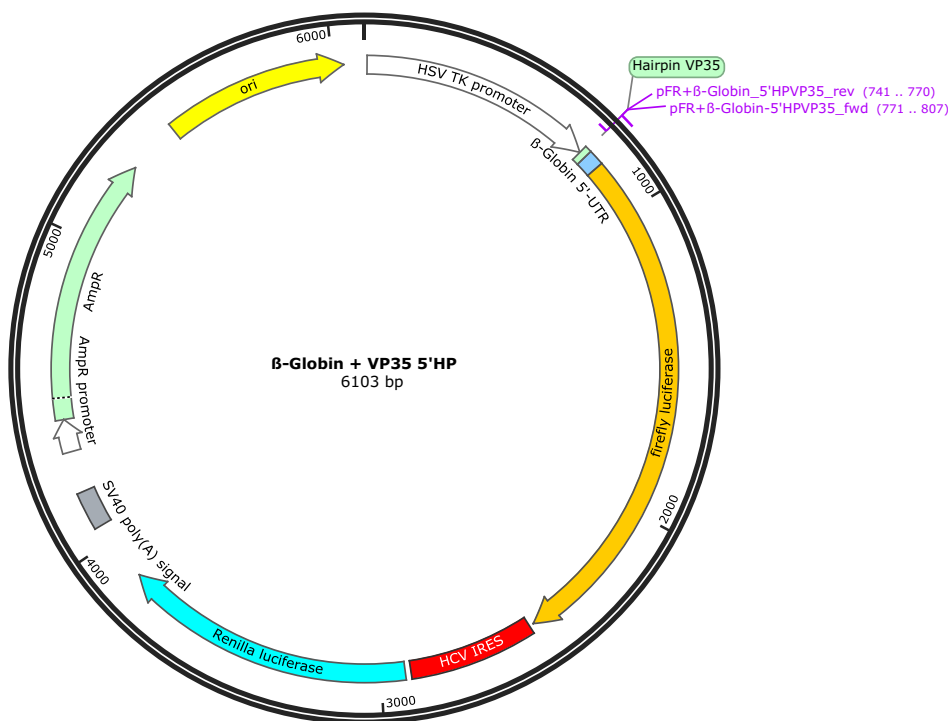
His Lys Ala Met Lys Arg Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu




firefly luciferase

3' 975 5'

Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+β-Globin-3'HPVP35_rev	34-mer	786 .. 819		65°C
/sequence = aatcttcacgtgtgtctgttgaggtgtagtg				
44% GC / 10.500,9 Da				
✓ pFR+β-Globin-3'HPVP35_fwd	41-mer	820 .. 860		65°C
/sequence = aaaaccttcacATGGAAGACGCCAAAAACATAAGAAAGG				
37% GC / 12.654,4 Da				





Primer	Length	Binding Sites		Tm
✓ pFR+β-Globin_5'HPVP35_rev	30-mer	741 .. 770		65°C
/sequence	= taatcttcacTAAAGCGGGTCGCTGCAGG 50% GC / 9213,0 Da			
✓ pFR+β-Globin-5'HPVP35_fwd	37-mer	771 .. 807		65°C
/sequence	= aaaccttcacacatttgctctgacacaactgtgtt 38% GC / 11.233,4 Da			

